

**Universidad Autónoma de Madrid**

**Departamento de Bioquímica**

**ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES  
CELULARES IMPLICADAS EN LA  
PATOGENIA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE**

**Marta Benito Miguel**

**Madrid, 2008**

**Departamento de Bioquímica**  
**Facultad de Medicina**  
**Universidad Autónoma de Madrid**

**ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES  
CELULARES IMPLICADAS EN LA  
PATOGENIA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE**

Memoria presentada por Marta Benito Miguel, Licenciada en Ciencias Biológicas,  
para optar al grado de Doctor.

Directores:

Dra. María Eugenia Miranda Carús

Dr. Emilio Martín Mola

Unidad de Investigación Hospital Universitario La Paz  
Madrid, 2008.

**MARÍA EUGENIA MIRANDA CARÚS**, Doctora en Medicina,

Médico Adjunto del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario La Paz de Madrid.

**EMILIO MARTÍN MOLA**, Doctor en Medicina,

Jefe del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario La Paz de Madrid.

Certifican, que Doña MARTA BENITO MIGUEL, licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: “Estudio de las interacciones celulares implicadas en la patogenia de la artritis reumatoide”, que presenta como Tesis para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste a efectos oportunos, expide y firma la presente en Madrid a 6 de Marzo de 2008.

Fdo.: Dra. María Eugenia Miranda Carús

Fdo.: Emilio Martín Mola



Este trabajo ha sido realizado en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario La Paz de Madrid. Se ha llevado a cabo mediante financiación concedida por la Fundación del Hospital Universitario La Paz, el Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 2003/01670 y 2006/01641) y por la Sociedad Española de Reumatología.

*A mi familia*

*“Lo esencial es invisible a los ojos”*

El Principito

## ***AGRADECIMIENTOS***



Después de compartir estos años con todos vosotros, sólo tengo palabras de agradecimiento por todos los momentos compartidos.

Mi más sincero y profundo agradecimiento a la Dra. María Eugenia Miranda, codirectora de esta tesis, por confiar en mí desde el primer momento. Gracias por tus enseñanzas y tu paciencia, en especial en la recta final, sin ti no lo habría conseguido.

Asimismo agradezco a mi codirector el Dr. Martín Mola, por facilitar el desarrollo de esta tesis. Gracias a todo el servicio de Reumatología, al Dr. Balsa, por su atención, su disposición y por unir la clínica con la básica. Y muy especialmente a las enfermeras Carmen, Cani, Estrella y María, por “pincharme” y pasearse a la nevera para ver si hay alguna “sorpresa”.

A la Dra. Bellón, por hacer que todo sea más sencillo, por regalarme tiempo y resolver mis dudas, porque además de una buena científica es una buena persona. Al Dr. Álvarez, por su paciencia, su ópera, su risa. A la Dra. Vilaboa por desear que el bien triunfe.

A mis excompañeros y además, amigos, del laboratorio, con los que tanto he aprendido y compartido, CrisCris1, Miguel Ángel, CrisCris2 y Alberto. Y a las que se quedan, Yolanda e Irene, cuidarme el chiringuito.

Al Reino de Cultivos, que me ha hecho tan feliz todo este tiempo, desde Laura, su primer caballero (por tranquilizarme en los momentos de estrés de tesis, por tus ironías y tus consejos), Esther la bufona (no sólo por las risas sino por mostrar a la Reina sus defectos, que no es una función agradable, pero necesaria), Teresa la Reina Madre (siempre pendiente de todo y de todos, mil gracias, sin ti el reinado no existiría), Merche la trovadora (lo siento, tus versiones nunca serán números uno)... Ah, se me olvidaba la sucesión del trono, la heredera del reino es... Gema con cargo vitalicio!!! Con tu sonrisa llegarás donde te propongas.

A todos los “sujetos sanos” en especial a Joaquín, Alba, Rocío y Andrés por estar dispuestos a donar siempre que lo necesitaba. A Silvia, que siempre se preocupa y ocupa de mí, cogidas de la mano ya llevamos andado mucho camino. A Carol, por estar siempre pendiente, a Prado, Virginia, Pilar, Maite, Lourdes, Miriam, Raúl, Pablo, Susana...

¡Cuánto os voy a echar de menos!

A toda mi familia, en especial a mi madre por estar pendiente de mí y no rechistar por mis malos humores y mis prisas, a partir de ahora canteremos más. A Isa, por ocuparse de todo, ahora y siempre, porque ya sabes que “sin ti, no soy nada...”. A mi padre que me ha inculcado el sentido del deber y la responsabilidad en el trabajo, y a Carlos por quererme tanto, a tu manera.

A mis amigas Pilar, Esther y Leonor, por el cariño que me dais siempre, por estar ahí en cada momento, sin esperar nada a cambio y dándome el tiempo que necesito “... que vuestra sonrisa os acompañe siempre”.

## ***RESUMEN/SUMMARY***

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune de etiología desconocida, caracterizada por una hiperplasia de fibroblastos sinoviales (FSAR) y una infiltración de macrófagos (MØ) y linfocitos. Las interacciones entre los diferentes tipos celulares son fundamentales para el inicio y el desarrollo de la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue estudiar las moléculas implicadas en estas interacciones. Para ello, establecimos cocultivos entre los distintos tipos celulares.

Se establecieron cocultivos de FSAR con linfocitos T (LT) procedentes de a) sangre periférica (SP) de controles sanos (LTSPC), b) sangre periférica de pacientes con AR de reciente comienzo que no habían recibido tratamiento (LTSPARo) y c) líquido sinovial (LS) de pacientes con AR (LTLSAR). Se estudió la expresión de moléculas de adhesión, marcadores de activación y citoquinas. Los LTLSAR y los LTSPARo indujeron en los FSAR un aumento de la expresión de superficie de IL-15 e ICAM-1, así como de IL-6, IL-8 e IL-15 intracelular. Sin embargo, los LTSPC modificaron mínimamente esta expresión. A su vez, los LTLSAR y LTSPARo mostraron en cocultivo con FS, un aumento de la expresión de TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-17, CD25 y CD69. Estas señales de reconocimiento se atenuaron significativamente al añadir anticuerpos bloqueantes frente a las moléculas estudiadas. Estos datos sugieren que las señales procedentes de los FSAR pueden contribuir a la proliferación de los LT en la articulación reumatoide. Al mismo tiempo, las citoquinas derivadas de los LT, modifican la actuación de los FS creando un asa de retroalimentación positiva que favorece la cronicidad de la inflamación articular. Una vez que el paciente alcanza la remisión completa, disminuye el estado de activación tanto de los FS como de los LT.

Durante el trayecto de nuestras investigaciones, observamos que los LTSPARo expresan RANKL en la membrana celular. Esta citoquina es fundamental en la formación de osteoclastos, las células encargadas de resorber el hueso. De igual forma, observamos que tanto los LT como los monocitos de estos pacientes expresan IL-15 de membrana, confirmando que existe un estado de pre-activación en ambos tipos celulares. Debido a esto, nos propusimos estudiar la implicación de los LT en la osteoclastogénesis realizando cocultivos autólogos de LT con monocitos de sangre periférica de AR de inicio en ausencia de citoquinas o factores de crecimiento exógenos y como controles realizamos cocultivos de SPC y de LSAR. Observamos osteoclastogénesis en los cocultivos obtenidos de sangre periférica de AR de inicio y de líquido sinovial de AR establecida, pero no en los cocultivos de sangre periférica de controles sanos.

A medida que desarrollábamos el estudio anterior advertimos que también los LT de sujetos sanos expresan IL-15, tanto a nivel de ARNm como proteico, y que esta es funcionalmente activa. Asimismo observamos que existía con frecuencia crecimiento de fibroblastos a partir del líquido sinovial y que en los extraídos de pacientes con AR, en numerosos casos se observaba expresión de DR5 de membrana, un marcador presente también en los fibroblastos de membrana sinovial de pacientes con AR.

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease, mainly characterized by the chronic inflammation of the synovium with a hyperplasia of synovial lining cells which interact with blood-derived mononuclear cells. It is well known that interactions between different cell types like synovial fibroblasts, macrophages and T lymphocytes (TLs) are crucial to the pathogenesis of the disease. However, the mechanism underlying these interactions remains unclear. In the current work, we cocultured the different cell types and investigated their contributions to the disease. In addition we characterized some of the molecules responsible for cell to cell crosstalk in RA.

To identify the molecules responsible for synovial fibroblast-T lymphocyte crosstalk in RA, synovial fibroblasts from patients with established RA (RAS Fibs) were cocultured with TLs from peripheral blood (PB) of early RA patients (RAPBTL). Adhesion molecules and cytokines were determined by flow cytometry, ELISA, and real-time PCR. RAPBTL induced an up-regulation of ICAM-1, intracellular IL-8, IL-6, IL-15, and surface IL-15 in cocultured RAS Fibs. In turn, RAPBTL showed an up-regulation of TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-17, CD25, and CD69 expression. Patients with early RA in whom clinical remission had been achieved with treatment, showed a significant decrease in the activation state of RAS Fibs and TLs. TL derived cytokines stimulate the expression of cytokines in RAS Fibs, thereby creating a feedback loop that favors persistent synovial inflammation.

In addition, we analyzed the interaction of TLs with monocytes. We observed that surface RANKL was expressed on freshly isolated RAPBTL. This molecule induces monocytes to differentiate into active osteoclasts, responsible for bone resorption. In addition, surface IL-15 was detected on freshly isolated T cells and monocytes from the PB of early RA patients, confirming the preactivation state of both cell types. In order to study the involvement of TLs in osteoclastogenesis and the cytokines implicated in this process; autologous T cell/monocyte cocultures, derived from the synovial fluid (SF) of patients with established RA and from the PB of early RA patients, were established in the absence of exogenous cytokines or growth factors resulting in osteoclast differentiation.

In addition, while conducting experiments, we noticed that TLs of healthy controls also express functional IL-15, both at mRNA and protein level. Moreover, we observed that fibroblasts often grew from the SF and RA synovial fluid fibroblasts selectively shared the expression of surface DR5 with fibroblasts from the synovial membrane of RA.

## ***ÍNDICE***

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
---------------------------	----------

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
--------------------------	----------

<b>1. ARTRITIS REUMATOIDE.....</b>	<b>4</b>
------------------------------------	----------

<b>1.1 Fibroblastos .....</b>	<b>5</b>
-------------------------------	----------

<b>1.2 Linfocitos T .....</b>	<b>6</b>
-------------------------------	----------

<b>1.3 Macrófagos .....</b>	<b>6</b>
-----------------------------	----------

<b>2. RELACIÓN ENTRE EL FIBROBLASTO SINOVIAL Y EL LINFOCITO T EN LA ARTRITIS REUMATOIDE.....</b>	<b>7</b>
--	----------

<b>3. OSTEOCLASTOGÉNESIS Y ACTIVACIÓN OSTEOCLÁSTICA .....</b>	<b>9</b>
---	----------

<b>3.1 Regulación de la osteoclastogénesis: Sistema OPG/RANK/RANKL.....</b>	<b>10</b>
---	-----------

<b>3.2 Función de los linfocitos T en la regulación de la osteoclastogénesis en la AR.....</b>	<b>11</b>
--	-----------

<b>3.3 Factores indirectos en la regulación de la osteoclastogénesis.....</b>	<b>12</b>
---	-----------

<b>4. CITOQUINAS .....</b>	<b>12</b>
----------------------------	-----------

<b>4.1 Interleuquina-15.....</b>	<b>13</b>
----------------------------------	-----------

<b>4.2 Otras citoquinas .....</b>	<b>15</b>
-----------------------------------	-----------

<b>4.3 TRAIL.....</b>	<b>15</b>
-----------------------	-----------

<b>5. BIOLOGÍA DEL LINFOCITO T .....</b>	<b>16</b>
--	-----------

<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
-----------------------	-----------

<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
-----------------------------------	-----------

<b>1. CULTIVOS CELULARES.....</b>	<b>21</b>
-----------------------------------	-----------

<b>1.1 Cultivos primarios.....</b>	<b>21</b>
------------------------------------	-----------

<b>1.1.1 Purificación de fibroblastos sinoviales.....</b>	<b>21</b>
---	-----------

<b>1.1.2 Purificación de fibroblastos de líquido sinovial .....</b>	<b>21</b>
---	-----------

<b>1.1.3 Purificación de Linfocitos T.....</b>	<b>22</b>
--	-----------

<b>1.1.4 Purificación de monocitos .....</b>	<b>22</b>
--	-----------

1.2 Condiciones de cocultivo.....	22
1.2.1 Cocultivo entre fibroblastos / linfocitos T.....	22
1.2.2 Cocultivo entre linfocitos T / monocitos.....	23
1.2.3 Contacto celular directo .....	23
 2. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	 24
 3. EXTRACCIÓN DE ARNm Y RT-PCR CUANTITATIVA.....	 25
 4. ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) .....	 26
 5. EXPERIMENTOS DE INHIBICIÓN .....	 26
 6. EFECTO DEL TRATAMIENTO <i>in vivo</i> .....	 27
 7. DETERMINACIÓN DE FENOTIPO Y ACTIVIDAD OSTEOCLÁSTICA .....	 27
 8. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN .....	 27
 9. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN FIBROBLASTOS.....	 28
9.1 Bioensayos de actividad metabólica .....	28
9.2 Diferenciación morfológica de las células viables y apoptóticas .....	29
9.3 Activación de caspasas.....	29
 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	 29
 11. PACIENTES.....	 29
11.1 Características de los pacientes con AR de inicio que donaron sangre periférica para obtener LT en el estudio de la relación entre FSAR y LT .....	29
11.2 Características de los pacientes con AR de inicio que donaron sangre periférica para obtener LT y monocitos en el estudio de la osteoclastogénesis.....	30
11.3 Controles experimentales .....	30
11.4 Características de los pacientes con diferentes artropatías que han donado líquido sinovial para la obtención de fibroblastos .....	30
11.5 Características de los sujetos sanos que donaron sangre periférica para obtener LT en el estudio de la IL-15 .....	31

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
<b>A. INTERACCIONES CELULARES EN LA PATOGENIA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE .....</b>	<b>33</b>
<b>A1. IMPLICACIÓN DE LAS INTERACCIONES ENTRE LOS LINFOCITOS T Y FIBROBLASTOS SINOVIALES EN LA ARTRITIS REUMATOIDE .....</b>	<b>33</b>
<b>1. LOS LINFOCITOS T ACTIVAN A LOS FIBROBLASTOS SINOVIALES EN EL COCULTIVO, INDUCIENDO UN AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN .....</b>	<b>33</b>
1.1 Efecto de los linfocitos T sobre la expresión de IL-15 y CD54 de membrana en los fibroblastos sinoviales .....	33
1.2 Efecto de los linfocitos T en la expresión (intercelular) de IL-15, IL-6 e IL-8 en los fibroblastos sinoviales .....	34
1.2.1 Estudio por citometría de flujo.....	34
1.2.2 Estudio de la expresión de ARNm.....	35
1.2.3 Estudio de la secreción de las citoquinas solubles.....	36
<b>2. LOS FIBROBLASTOS SINOVIALES ACTIVAN A LOS LINFOCITOS T EN EL COCULTIVO, INDUCIENDO UN AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS Y MOLÉCULAS DE SUPERFICIE .....</b>	<b>36</b>
2.1 Efecto de los fibroblastos sinoviales sobre la expresión de CD69 y CD25 en la superficie los linfocitos T .....	36
2.2 Efecto de los fibroblastos sinoviales sobre la expresión de las citoquinas IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ e IL-17 en los linfoncitos T .....	37
2.2.1 Estudio por citometría de flujo intracelular .....	37
2.2.2 Estudio de la expresión de ARNm.....	38
2.2.3 Estudio de la secreción de las citoquinas solubles.....	39
<b>3. MOLÉCULAS DE MEMBRANA Y CITOQUINAS IMPLICADAS EN EL DIÁLOGO ENTRE LOS FIBROBLASTOS SINOVIALES Y LOS LINFOCITOS T. TRATAMIENTO CON ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES .....</b>	<b>39</b>
3.1 Tratamiento con inhibidores de IL-15, CD54 y su combinación para estudiar su implicación en la activación de LT en el cocultivo con FSAR .....	39



3.2 Tratamientos con inhibidores de moléculas de membrana y citoquinas producidas por los linfocitos T para estudiar la implicación de cada una de ellas en la activación de los FSAR.....	40
 4. LOS FIBROBLASTOS SINOVIALES DE ARTROSIS (FSA) EN REPOSO Y LOS FIBROBLASTOS DE PIEL (FP) NO EXPRESAN CONSTITUTIVAMENTE IL-15 DE MEMBRANA: LA CONDUCTA DE FSA Y FP EN EL COCULTIVO CON LT .....	41
4.1 Estudio comparativo de la activación del cocultivo entre los diferentes tipos de fibroblastos. ....	41
4.2 Efecto de la IL-15 de membrana de los fibroblastos fijados con paraformaldehído (PFA) sobre los linfocitos T.....	41
 5. EL EFECTO DEL CONTROL DE LA ENFERMEDAD EN LAS INTERACCIONES ENTRE FSAR /LT <i>ex vivo</i> .....	42
 A2. IMPLICACIÓN DE LAS INTERACCIONES ENTRE LOS LINFOCITOS T Y MONOCITOS EN LA PATOGENIA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE: OSTEOCLASTOGÉNESIS.....	43
 1. EXPRESIÓN DE IL-15 Y RANKL EN LOS LINFOCITOS T Y MONOCITOS DE PACIENTES CON AR .....	43
1.1 Expresión de IL-15 y RANKL en los linfocitos T de pacientes con AR.....	43
1.2 Expresión de IL-15 en los monocitos de pacientes de AR .....	44
 2. DIFERENCIACIÓN OSTEOCLASTOGÉNICA EN COCULTIVOS DE LINFOCITOS T / MONOCITOS AUTÓLOGOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON AR DE INICIO Y DE LÍQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON AR ESTABLECIDA... ..	45
2.1 Formación de osteoclastos.....	45
2.2 Capacidad resortiva.....	45
2.3 Secreción de mediadores solubles.....	46
 3. EFECTO DE LA OPG Y DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES EN LA OSTEOCLASTOGÉNESIS PRODUCIDA EN LOS COCULTIVOS DE LINFOCITOS T / MONOCITOS .....	47

4. EFECTO DE LAS CITOQUINAS SOLUBLES LIBERADAS EN LOS COCULTIVOS LINFOCITOS T / MONOCITOS EN LA OSTEOCLASTOGÉNESIS <i>ex vivo</i> .....	48
5. EFECTO DEL CONTROL DE LA ENFERMEDAD SOBRE LA OSTEOCLASTOGÉNESIS OBSERVADA <i>ex vivo</i> .....	49
 <b>B. DESCRIPCIÓN DE NUEVAS MOLÉCULAS EXPRESADAS POR FIBROBLASTOS DEL LÍQUIDO SINOVIAL DE ARTRITIS REUMATOIDE Y LINFOCITOS T HUMANOS.....</b>	<b>51</b>
 <b>B1. LOS FIBROBLASTOS DE LÍQUIDO SINOVIAL DE ARTRITIS REUMATOIDE EXPRESAN TRAILR2 (DR5) QUE ES FUNCIONALMENTE ACTIVO.....</b>	<b>51</b>
1. EXPRESIÓN DE DR5 EN FIBROBLASTOS DE LÍQUIDO SINOVIAL.....	51
2. EL DR5 EXPRESADO EN LA MEMBRANA DE LOS FLSAR ES FUNCIONALMENTE ACTIVO: EFECTO DE UN ANTICUERPO AGONISTA ANTI-DR5 EN LOS FLSAR DR5+ Y DR5- .....	52
 <b>B2. LOS LINFOCITOS T HUMANOS EXPRESAN CONSTITUTIVAMENTE IL-15, QUE INDUCE PROLIFERACIÓN <i>ex vivo</i> POR MECANISMOS AUTOCRINOS/YUXTACRINOS.....</b>	<b>54</b>
1. LOS LINFOCITOS T HUMANOS SE DIVIDEN EN CULTIVO EN AUSENCIA DE ESTÍMULOS EXÓGENOS, Y LA VELOCIDAD DE LA DIVISIÓN ESTÁ EN FUNCIÓN DE LA DENSIDAD CELULAR.....	54
2. EFECTO DE LOS ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES ANTI-IL15 SOBRE LA DIVISIÓN HOMEOSTÁTICA <i>ex vivo</i> DE LOS LINFOCITOS T .....	56
3. LOS LINFOCITOS T HUMANOS EXPRESAN CONSTITUTIVAMENTE IL-15 Y TODAS LAS CADENAS DE SU RECEPTOR.....	57

<b><i>DISCUSIÓN</i></b> .....	59
<b>1. IMPLICACIÓN DE LAS INTERACCIONES ENTRE LOS LINFOCITOS T Y FIBROBLASTOS SINOVIALES EN LA ARTRITIS REUMATOIDE</b> .....	60
<b>2. IMPLICACIÓN DE LAS INTERACCIONES ENTRE LOS LINFOCITOS T Y MONOCITOS EN LA PATOGENIA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE: OSTEOCLASTOGÉNESIS</b> .....	65
<b>3. PRIMERA DESCRIPCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS EN FIBROBLASTOS DE LÍQUIDO SINOVIAL DE ARTRITIS REUMATOIDE Y EN LINFOCITOS T HUMANOS</b> .....	67
3.1 Los fibroblastos de líquido sinovial de artritis reumatoide expresan TRAILR2 (DR5) que es funcionalmente activo.....	67
3.2 Los linfocitos T humanos expresan constitutivamente IL-15 <i>ex vivo</i> por mecanismos autocrinos/yuxtacrinos.....	69
<b><i>CONCLUSIONES</i></b> .....	72
<b><i>BIBLIOGRAFÍA</i></b> .....	74

## ***ABREVIATURAS***

AcMc	Anticuerpo monoclonal
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AIC	Artritis inducida por colágeno
AINEs	Medicamentos antiinflamatorios no esteroideos
AR	Artritis reumatoide
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CFSE	“Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester”
DAS	Puntuación de la actividad de la enfermedad “Disease activity score 28”
D.E.	Desviación estándar
DR5	Receptor de muerte (Death receptor 5) también denominado TRAIL-R2
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
ELISA	“Enzyme-linked immunosorbent assay”
FADD	Proteína asociada a Fas con un dominio de muerte celular (Fas-associated via death domain)
FAMEs	Fármacos modificadores de enfermedad
FLS	Fibroblastos de líquido sinovial
FLSAR	Fibroblastos de líquido sinovial de artritis reumatoide
FP	Fibroblastos de piel
FS	Fibroblastos sinoviales
FSA	Fibroblastos sinoviales de artrosis
FSAR	Fibroblastos sinoviales de artritis reumatoide
ICAM-1 o CD54	Molécula de adhesión intercelular (Intercellular adhesion molecule-1)
IFM	Intensidad de fluorescencia media
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
IL-R	Receptor de la interleuquina
IP	Yoduro de propidio
LFA-1	“Lymphocyte function-associated antigen-1” también denominado CD11a
LS	Líquido sinovial
LT	Linfocitos T
LT <sub>M</sub>	LT de memoria
LT <sub>MC</sub>	LT de memoria central
LT <sub>MP</sub>	LT de memoria periférica o efectores
LT <sub>N</sub>	LT vírgenes o <i>naïve</i>
LTLSAR	Linfocitos T de líquido sinovial de pacientes con AR establecida
LTSPARo	Linfocitos T de sangre periférica de pacientes con AR de inicio
LTSPC	Linfocitos T de sangre periférica de sujetos sanos o controles

M-CSF	Factor de estimulación de colonias de macrófagos (Macrophage-colony stimulating factor)
MoLSAR	Monocitos de líquido sinovial de pacientes con AR establecida
MoSPARo	Monocitos de sangre periférica de pacientes con AR de inicio
MoSPC	Monocitos de sangre periférica de sujetos sanos o controles
MØ	Macrófagos
MTX	Metotrexato
NF-κB	Factor nuclear de unión al gen de la cadena kappa de las inmunoglobulinas
OPG	Osteoprotegerina
PARP	Polimerasa poli(ADP-ribosa)
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
RANK	Receptor activador del factor nuclear κB (Receptor Activator of Nuclear Factor-κB Ligand)
RANKL	Ligando del RANK
RANKLs	RANKL soluble
RT-PCR	Retrotranscripción seguido de la reacción en cadena de la polimerasa
SDF-1	“stromal-derived cell factor-1”
SP	Sangre periférica
TCR	Receptor de linfocitos T
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa (Tumor necrosis factor α)
TRAIL	Ligando que induce apoptosis relacionado con el TNF (TNF-related apoptosis inducing ligand)
TRAIL-R	Receptor del TRAIL
TRAP	Fosfatasa ácida tartrato resistente (Tartrate-resistant acid phosphatase)

# ***INTRODUCCIÓN***

## **1. ARTRITIS REUMATOIDE.**

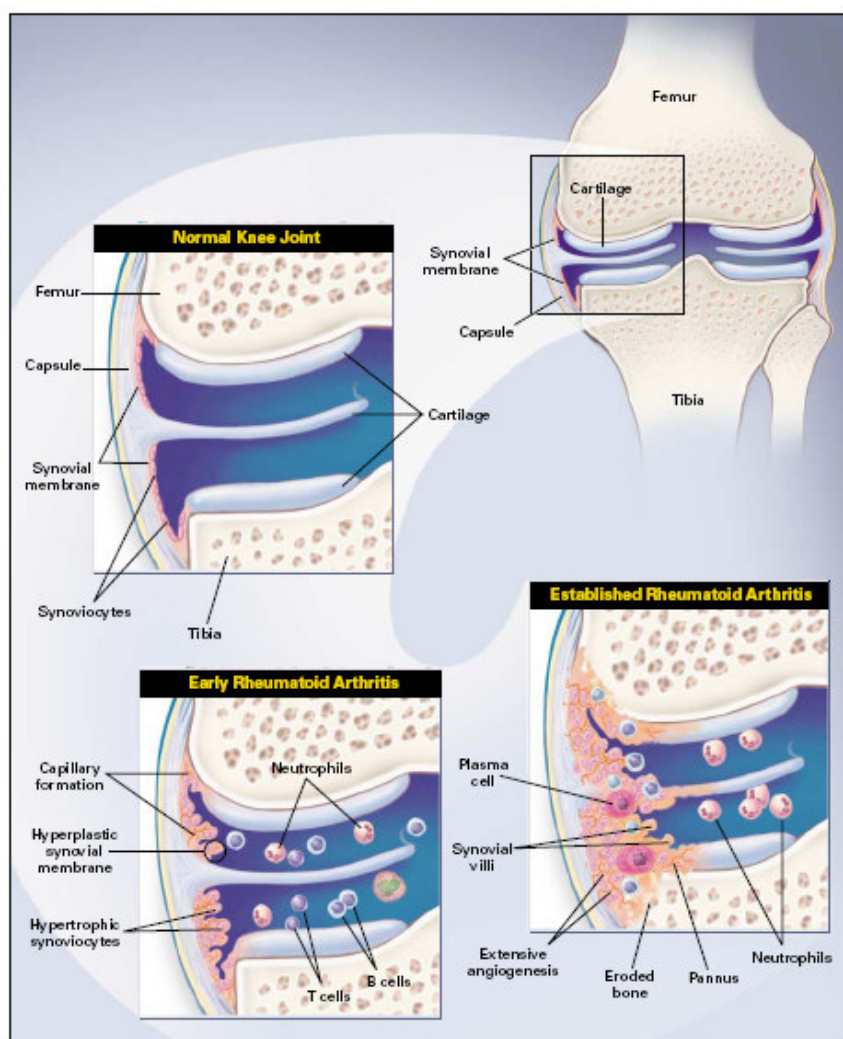
La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune de etiología desconocida. Se caracteriza por la inflamación crónica de la membrana sinovial que recubre internamente la cápsula articular (Albani S 1997). Esta inflamación puede derivar en un daño crónico de la articulación, dando como resultado dolor, deformidades articulares y pérdida funcional, afectando por tanto de manera significativa la calidad de vida del paciente (Choy and Panayi 2001). Las articulaciones pequeñas de las extremidades son las más frecuentemente afectadas. La severidad de la AR abarca un amplio espectro siendo muy variable el grado de destrucción articular. En algunos pacientes pueden existir manifestaciones sistémicas, como afectación pulmonar, afectación cardíaca y vasculitis sistémica (Doan and Massarotti 2005) contribuyendo a la mortalidad del paciente.

La incidencia de la enfermedad es del 0.5-1.0% en la población mundial, siendo 3 veces superior en mujeres que en hombres. Aunque el inicio de la enfermedad puede darse a cualquier edad, generalmente se encuentra entre los 30 a 50 años. Los factores que contribuyen a la incidencia y al curso de la enfermedad son genéticos y ambientales. Los principales factores de riesgo son la susceptibilidad genética, el sexo, ser fumador y la edad, existiendo un máximo de incidencia alrededor de los 50 años. También influyen los factores étnicos, los niveles hormonales y la dieta (Alamanos and Drosos 2005).

Los tratamientos contra la AR están dirigidos a reducir el dolor y el malestar, prevenir las deformidades y la pérdida de la función de la articulación. Para ello, la inflamación debe ser suprimida. Primeramente se utilizan terapias tempranas y agresivas que incluyen combinaciones de varios fármacos modificadores de la enfermedad (FAMEs). Otra alternativa utilizada en el caso en que los FAMEs no reduzcan la actividad de la enfermedad, son las terapias biológicas. La introducción de nuevas terapias, como los agentes bloqueantes del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$  o “tumor necrosis factor  $\alpha$ ”), han logrado disminuir el grado de activación la enfermedad. Desafortunadamente, estas terapias no constituyen una cura definitiva, ya que se necesita una inmunosupresión sistémica continua para mantener los beneficios clínicos (Goronzy and Weyand 2005).

La membrana sinovial en condiciones fisiológicas es una estructura delgada que consta de una capa íntima formada por fibroblastos (FS) y macrófagos (MØ), y una subíntima en la que se encuentran FS, MØ y vasos sanguíneos. En la AR, la membrana sinovial proliferación agresivamente e invade el cartílago y el hueso, formando un frente denominado “pannus” que es responsable del daño progresivo en la articulación (Fig. 1) (Choy and Panayi 2001).





**Figura 1.** Patogénesis de la artritis reumatoide (Choy and Panayi 2001).

El tipo celular más abundante en la membrana sinovial inflamada son los FS. El aumento en el número de FS es secundario a una hiperplasia de los fibroblastos de la capa íntima (Pap, Muller-Ladner et al. 2000). En la inflamación crónica de la AR participan muchos elementos de la respuesta inmune. Los linfocitos T (LT) y MØ sinoviales son las poblaciones más abundantes del infiltrado de la membrana sinovial, aunque también existen neutrófilos, linfocitos B y células dendríticas (Fox 2000). La acumulación de estas células inflamatorias se debe a múltiples factores como la angiogénesis y la producción de quemoquinas, de forma que se retienen localmente y proliferan (Banning 2005).

### 1.1 Fibroblastos.

Los fibroblastos poseen unas propiedades muy heterogéneas dependiendo de la región anatómica en donde se encuentren. Estos fenotipos son característicos de cada localización y se mantienen incluso después del cultivo prolongado in vitro (Smith, Smith et al. 1997). Esta diversidad fenotípica puede ser significativa al determinar la susceptibilidad intrínseca de

diferentes órganos a los procesos inflamatorios. Por ello, para estudiar *in vitro* la patogenia de la enfermedad es necesario utilizar fibroblastos derivados de la localización anatómica afectada en el proceso de interés.

En la AR existe una hiperplasia de los FS, también conocidos como sinoviocitos tipo II, que poseen un comportamiento biológico muy específico con un gran potencial invasivo y destructivo, responsable en gran parte de las características de la respuesta inflamatoria articular (Pap, Muller-Ladner et al. 2000).

Se ha descrito que pueden crecer fibroblastos en el líquido sinovial de pacientes con AR (FLSAR) y se cree que proceden de descamaciones de la membrana sinovial (Castor and Dorstewitz 1966; Mackay, Panayi et al. 1974; Neidhart, Seemayer et al. 2003). Estos FLSAR son capaces de contribuir a la destrucción del cartílago; por esto, Neidhart y col. sugieren que “pueden favorecer la progresión de la AR independientemente de la acción de la hiperplasia del tejido sinovial” (Neidhart, Seemayer et al. 2003).

## **1.2 Linfocitos T.**

Debido a la abundancia de linfocitos T CD4 en el tejido sinovial y en el líquido sinovial de pacientes con AR, se cree que su participación es importante en la patogenia (Albani S 1997; Striebig, Falta et al. 1998). Sin embargo, su función en la iniciación y perpetuación de la AR ha sido controvertida por varias causas: no se ha identificado un antígeno que desencadene la enfermedad (Kotzin, Falta et al. 2000); la mayoría de los LT en la membrana sinovial son policlonales; en el líquido sinovial hay niveles bajos de interleuquina-2 (IL-2) y solo una pequeña fracción de LT sinoviales expresan el receptor  $\alpha$  de la IL-2 (IL-2R $\alpha$ ) (Fox 1997). Los LT en la membrana sinovial pueden interactuar con células presentadoras de antígeno (Aarvak and Natvig 2001); y es posible también, que la interacción directa entre los LT con los FS sea importante para la inflamación crónica en la AR (McInnes, Leung et al. 2000).

## **1.3 Macrófagos.**

El número y grado de activación de los MØ en la membrana sinovial de los pacientes con AR se correlaciona con la severidad de la lesión. Los MØ favorecen la inflamación permanente y la destrucción de la sinovial al liberar citoquinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) en los compartimentos sinoviales. La gran variedad de estas citoquinas derivadas de MØ y su amplio efecto indica que los MØ actúan como amplificadores locales y sistémicos de la severidad y perpetuación de la enfermedad (Kinne, Brauer et al. 2000).

La estirpe monocito/macrófago tiene gran importancia en la destrucción articular. Los osteoclastos se forman a partir de la fusión de células mononucleares de la familia de los monocitos/macrófagos, bajo la influencia de interacciones celulares y de citoquinas (Teitelbaum 2000). Estudios histopatológicos de la unión hueso-pannus y la capa subcondral de pacientes con

AR, indican que los osteoclastos intervienen fundamentalmente en la pérdida de hueso subcondral y marginal en la artritis inflamatoria (Gravallese, Harada et al. 1998).

## **2. RELACIÓN ENTRE EL FIBROBLASTO SINOVIAL Y EL LINFOCITO T EN LA ARTRITIS REUMATOIDE.**

Los modelos patogénicos de AR hacen énfasis en las interacciones entre LT y células presentadoras de antígeno profesionales (Chizzolini, Chicheportiche et al. 1997; Fox 1997; Sebbag, Parry et al. 1997). La tremenda capacidad de destrucción tisular y proinflamatoria de los fibroblastos sinoviales de AR (FSAR) ha sido atribuida a la acción de citoquinas derivadas de los macrófagos sinoviales (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), así como a posibles mutaciones somáticas de los fibroblastos que alterarían su capacidad proliferativa (Firestein 1996). De hecho, el tratamiento con anti-TNF $\alpha$  ha demostrado mejorar significativamente los parámetros clínicos y retrasar las erosiones óseas (Dayer, Feige et al. 2001; Graninger and Smolen 2001). Por ello, existen múltiples trabajos orientados a estudiar la función de los monocitos/macrófagos como mediadores de los sucesos iniciales en las sinovitis inflamatorias. Sin embargo, un 25% de los pacientes son resistentes a este tratamiento. Por tanto, es posible que existan otros mecanismos alternativos implicados en la patogenia de la AR (Gay 2001), como son las interacciones directas entre LT y FS sin intervención de los monocitos/macrófagos.

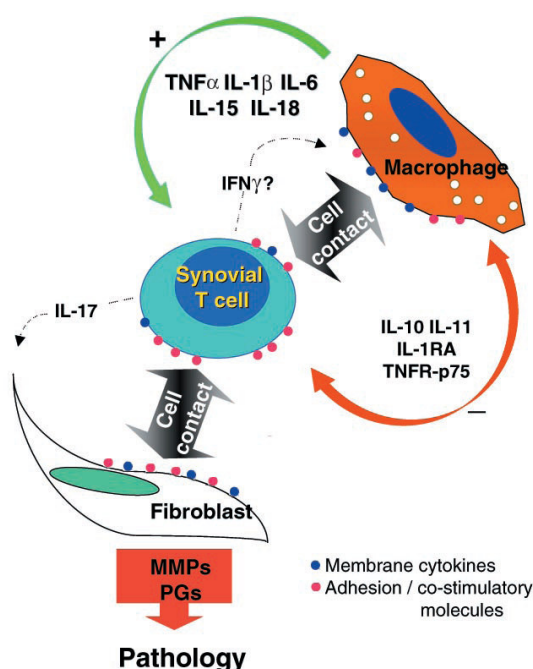
Se ha confirmado que los fibroblastos son importantes en la modulación de la función linfocitaria mediante la producción de citoquinas, quemoquinas y matriz extracelular y definen microambientes tisulares que pueden determinar la transición de la inflamación aguda hacia un proceso inflamatorio crónico (Buckley, Pilling et al. 2001). Además existen pocos indicios de que la perpetuación de la inflamación crónica en la AR sea dependiente de antígeno, por eso se especula que en ausencia de estimulación antigénica, el microambiente creado por los fibroblastos activados podría contribuir a la patogenia de varias enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (Pap, Muller-Ladner et al. 2000), la fibrosis pulmonar (Zhang, Cao et al. 1998; Hogaboam, Bone-Larson et al. 1999), la fibrosis intersticial renal (Hogaboam, Steinhauser et al. 1998), la oftalmopatía de la enfermedad de Graves-Basedow (Pritchard, Horst et al. 2002) y el bloqueo cardíaco congénito asociado a anticuerpos anti-SSA/Ro-SSB/La (Clancy R 2001).

Los LT modulan la proliferación de los fibroblastos y la secreción de proteínas de la matriz extracelular *in vitro* (Postlethwaite 1995; Rezzonico, Burger et al. 1998; Murakami, Hino et al. 1999). La síntesis de colágeno tipo I y III en FS puede ser modulada a nivel transcripcional a través de contacto celular con LT activados por mitógeno. Estos efectos no son específicos de tejido pues se obtuvo resultados similares usando fibroblastos de piel. También se observó que el contacto directo con LT de sangre periférica o clones CD4 y CD8 derivados de la membrana

sinovial, induce la producción de metaloproteasas y prostaglandina por parte de los FS (Burger, Rezzonico et al. 1998). Se ha descrito que los LT en reposo altamente purificados activan a los FS *in vitro*, en ausencia de mitógenos, induciendo o incrementando, a nivel de ARNm y/o proteína, la producción de estromelina, IL-6, IL-8 y prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Yamamura, Gupta et al. 2001).

Buckley y col. describieron que los FSAR influyen en la acumulación y supervivencia de los LT en la sinovial reumatoide y modifican su biología (Buckley, Pilling et al. 2001). Los LT aislados entran rápidamente en apoptosis (muerte celular programada), mientras que el cocultivo con FS evita este proceso (Scott, Pandolfi et al. 1990; Salmon, Scheel-Toellner et al. 1997). De igual forma, los FSAR previenen la apoptosis de los linfocitos B (Lindhout, van Eijk et al. 1999). También se ha descrito que los FSAR inducen proliferación de LT en cultivos de larga duración (Vallejo, Yang et al. 2003). Los FSAR son una fuente importante de IL-16, que posee una acción quimiotáctica para los LT CD4, atrayéndolos hacia la sinovial por mecanismos independientes de antígeno (Franz, Kolb et al. 1998). La IL-16 también parece ser responsable, al menos en parte, de la escasa producción de IL-2 por parte de los LT sinoviales (Ogasawara, Takeda-Hirokawa et al. 1999). Otro factor que parece intervenir en la acumulación de los LT en la sinovial reumatoide es la quemoquina “stromal-derived cell factor-1” (SDF-1) que es producida por los FS. Los linfocitos T de la sinovial reumatoide expresan niveles elevados de CXCR4, el receptor de SDF-1, por lo que son atraídos a la sinovial al interactuar SDF-1/CXCR4 (Nanki, Hayashida et al. 2000).

Estudios *in vitro* sugieren que los LT se unen a FS a través de la interacción entre el “lymphocyte function-associated antigen-1” (LFA-1, también denominado CD11a/CD18) y la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1, también denominada CD54) y la interacción LFA-3 (CD2)/CD58 (Haynes, Grover et al. 1988; Abraham, Lupoli et al. 1991; Krzesicki, Fleming et al. 1991; Shingu, Hashimoto et al. 1994). De la misma forma, las citoquinas de membrana de los LT, el TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  parecen importantes en las interacciones entre LT y FS; todavía no se ha definido la función de otras moléculas de superficie como el CD69, CD154, CD11b o CD40/CD40L (Burger, Rezzonico et al. 1998; McInnes, Leung et al. 2000).



**Figura 2.** Los linfocitos T (LT) sinoviales pueden activar a macrófagos (MØ) y fibroblastos sinoviales (FS), por contacto directo y/o citoquinas solubles. A su vez, los MØ y FS actúan sobre los LT creando mecanismos de retroalimentación positiva que perpetúan la inflamación articular (McInnes, Leung et al. 2000).

A pesar de los avances realizados, actualmente existen muchas incógnitas sobre la naturaleza exacta de las citoquinas solubles y ligandos de membrana implicados en las interacciones entre LT y fibroblastos sinoviales, y las consecuencias exactas de esta interacción (Rezzonico, Burger et al. 1998; McInnes, Leung et al. 2000). El esclarecimiento de estos mecanismos probablemente tendrá importantes implicaciones en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas (McInnes, Leung et al. 1997).

### 3. OSTEOCLASTOGÉNESIS Y ACTIVACIÓN OSTEOCLÁSTICA.

El hueso es un material vivo y dinámico que se renueva continuamente y experimenta una permanente reconstrucción durante la vida del individuo. Su integridad estructural y funcional se mantiene a través de un proceso conocido como remodelado óseo, que implica un equilibrio entre la resorción de hueso llevada a cabo por los osteoclastos y su formación, realizada por los osteoblastos. Ambos tipos celulares constituyen la “unidad de remodelado óseo” y representan el elemento básico funcional de este tejido (Frost, 1964).

Al igual que en el proceso de resorción ósea fisiológica, los osteoclastos son el principal tipo celular implicado en la resorción ósea patológica. Estudios histopatológicos de la interfase pannus-hueso y la capa subcondral de pacientes con AR han revelado la presencia de células multinucleadas que expresan marcadores específicos de osteoclastos como la fosfatasa ácida

tartrato resistente (TRAP) (Gravallese, Harada et al. 1998; Goldring 2002; Romas, Gillespie et al. 2002).

Los osteoclastos son células grandes (100  $\mu$ m) capaces de disolver el mineral y degradar la matriz ósea con enzimas proteolíticas. Poseen dos especializaciones en la membrana: un borde en cepillo, que es donde tiene lugar la resorción y una zona clara de anclaje a la matriz. Son células multinucleadas debido a que están formadas por la fusión de precursores mononucleares de la familia de los monocitos/macrófagos, con gran cantidad de mitocondrias y vacuolas (Teitelbaum 2000). Su vida media es 3-4 semanas.

El precursor inicial pluripotencial atraviesa varios estadios previos, antes de convertirse en un osteoclasto enzimáticamente activo. El ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL) en cooperación con el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) son los dos factores necesarios y suficientes para completar el ciclo de maduración de los osteoclastos activos a partir de sus precursores inmaduros (Yasuda, Shima et al. 1998; Kwan Tat, Padrines et al. 2004).

### **3.1 Regulación de la osteoclastogénesis: Sistema OPG/RANK/RANKL.**

Los conocimientos actuales acerca de la regulación de la osteoclastogénesis se basan en el sistema OPG/RANK/RANKL (Yasuda, Shima et al. 1998; Burgess, Qian et al. 1999).

El receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B (RANK) se encuentra principalmente en la superficie de precursores osteoclásticos y osteoclastos.

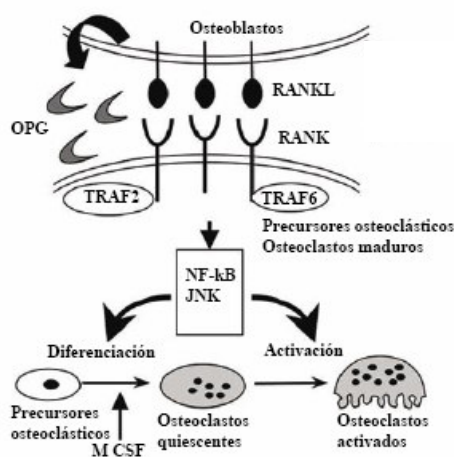
La citoquina RANKL es un miembro de la superfamilia del TNF, que se une al RANK (Lacey, Timms et al. 1998; Gravallese 2002). Se identificó originalmente como un factor de supervivencia para células dendríticas producido por los linfocitos T denominándose TRANCE (“TNF-related activation induced cytokine” o citoquina inducida por activación relacionada con TNF) (Romas, Gillespie et al. 2002). Se han identificado tres isoformas de RANKL, dos de ellas ancladas a la membrana y una soluble (RANKLs) (Ikeda, Kasai et al. 2003) que se libera de la superficie celular por la acción de metaloproteasas (Lum, Wong et al. 1999). El ARNm del RANKL se expresa en tejido óseo y también en médula ósea y tejidos linfáticos (Wong, Josien et al. 1997; Yasuda, Shima et al. 1998).

La interacción entre el RANKL-RANK es el principal responsable de la osteoclastogénesis en condiciones fisiológicas (Malyankar, Scatena et al. 2000), favorece la maduración y activación osteoclástica, aumentando la resorción del hueso e impide la apoptosis del osteoclasto maduro (Romas, Gillespie et al. 2002; Udagawa, Kotake et al. 2002; Theoleyre, Wittrant et al. 2004).

La osteoprotegerina (OPG) es un receptor señuelo soluble que compite con el RANK por la unión al RANKL y bloquea su efecto osteoclastogénico (Lacey, Timms et al. 1998; Burgess, Qian et al. 1999) (Fig. 3).

El balance entre RANKL y OPG regula el desarrollo y la activación de los osteoclastos (Boyle y col., 2003). Durante la diferenciación osteoblástica, la expresión de RANKL disminuye mientras que incrementa la expresión de OPG, interrumpiéndose la diferenciación y activación osteoclástica. Por tanto, los efectos biológicos de OPG en el remodelado óseo son opuestos a los de RANKL (Lacey, Timms et al. 1998).

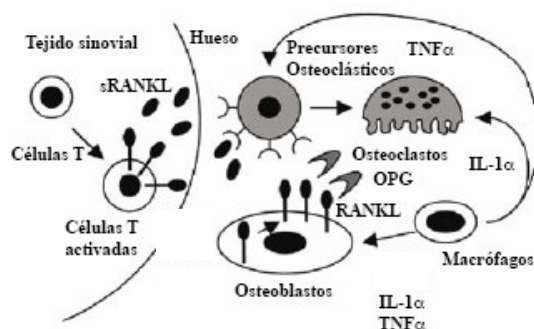
Se ha demostrado que en líquido sinovial de pacientes con AR los niveles de RANKL soluble están elevados, mientras que los niveles de OPG están disminuidos. Las concentraciones de RANKL soluble en el líquido sinovial de pacientes con AR son muy superiores a las observadas en los líquidos sinoviales de pacientes con artrosis o gota (Udagawa, Kotake et al. 2002).



**Figura 3. Representación esquemática de la diferenciación osteoclástica inducida por osteoblastos.** El RANKL en la membrana celular de osteoblastos/células estromales, se une a su receptor RANK presente en precursores osteoclásticos y osteoclastos maduros. La osteoprotegerina (OPG) inhibe competitivamente la interacción RANKL-RANK. La señalización RANK es transducida por el factor 2 y 6 asociados al receptor del TNF (TRAF2, TRAF6), provocando la activación del NFκB y la quinasa Jun (JNK), que estimulan la diferenciación y activación de los osteoclastos. M-CSF, factor de estimulación de colonias de macrófagos (Udagawa, Kotake et al. 2002).

### 3.2 Función de los linfocitos T en la regulación de la osteoclastogénesis en la AR.

Bajo condiciones fisiológicas, la formación de osteoclastos requiere contacto celular entre los osteoblastos y los precursores osteoclásticos. Sin embargo, en ciertas condiciones patológicas como la AR, en los focos inflamatorios, los LT y los FSAR activados expresan RANKL (Gravallese, Manning et al. 2000; Romas, Bakharevski et al. 2000; Shigeyama, Pap et al. 2000; Dai, Nishioka et al. 2004). Por lo tanto son capaces de inducir diferenciación osteoclástica en monocitos contribuyendo a la pérdida patológica de masa ósea (Takayanagi, Iizuka et al. 2000; Kotake, Udagawa et al. 2001) (Fig. 4).



**Figura 4. Posible mecanismo de formación osteoclástica por linfocitos T activados en la AR.** Los linfocitos T activados presentes en el tejido sinovial también producen RANKL de membrana, que puede ser procesado enzimáticamente y ser liberado como forma soluble (sRANKL). El  $\text{TNF}\alpha$  actúa directamente sobre precursores de osteoclastos, estimulando la osteoclastogénesis por un mecanismo independiente de RANKL-RANK. IL-1 induce la activación del osteoclasto. OPG, osteoprotegerina (Udagawa, Kotake et al. 2002).

### 3.3 Factores indirectos en la regulación de la osteoclastogénesis.

El proceso de osteoclastogénesis se regula por factores de distinta naturaleza y entre ellos diversas citoquinas. Entre las citoquinas que estimulan la osteoclastogénesis se encuentran el  $\text{TNF}\alpha$  y las citoquinas como IL-1, IL-6, IL-11, IL-15 o IL-17. Entre las que inhiben este proceso se encuentran IL-4, IL-10, IL-12, IL-13 o IL-18 (Zaidi y col., 2003). Dichos factores pueden actuar directamente sobre células preosteoclásticas u osteoclásticas modulando su diferenciación o actividad; o regulando las interacciones RANK-RANKL y/o OPG-RANKL (Bezerra y col., 2005).

Varios estudios han demostrado que el tejido sinovial de pacientes con AR es una fuente rica en citoquinas proinflamatorias que contribuyen a la osteoclastogénesis actuando sinérgicamente con el RANKL ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-15 e IL-17) (Kotake, Udagawa et al. 1999; Ogata, Kukita et al. 1999; D, Ireland et al. 2004; Lubberts, Koenders et al. 2005; Wei, Kitaura et al. 2005). De hecho, tanto las células T como los macrófagos, regulan la osteoclastogénesis de manera indirecta a través de la secreción de estas citoquinas osteoclastogénicas (Zou, Hakim et al. 2001; Kitaura, Sands et al. 2004).

## 4. CITOQUINAS.

Las citoquinas comprenden un amplio grupo de proteínas que median la comunicación entre células. Están implicadas en la respuesta inmunológica con un efecto proinflamatorio o antiinflamatorio, modulando la actividad funcional de células individuales y de tejidos, con un efecto autocrino y paracrino.

Las citoquinas son importantes en la iniciación y la perpetuación de la inflamación de la membrana sinovial. Al activarse localmente los LT y MØ, producen un gran número de citoquinas. Estas a su vez, activan a las células sinoviales a producir enzimas proteolíticas que inician la



destrucción del cartílago, ligamentos y tendones de la articulación. El sistema de citoquinas es una red muy compleja tanto en la regulación de su expresión y como en su función (Choy and Panayi 2001). Se han detectado un gran número de citoquinas en el líquido sinovial, incluyendo IL-1, IL-8, TNF $\alpha$ , interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) e IL-15.

#### **4.1 Interleuquina-15.**

La IL-15 regula la activación y proliferación de los linfocitos T y las células “natural killer”. También se ha descrito que la IL-15 favorece la diferenciación de monocitos a osteoclastos (Ogata, Kukita et al. 1999).

Las fuentes conocidas de IL-15 fisiológicamente activa son las células dendríticas, las células del estroma de la médula ósea, los monocitos/macrófagos y los fibroblastos (Dubois, Mariner et al. 2002; Kurowska, Rudnicka et al. 2002; Budagian, Bulanov et al. 2004; Neely, Epelman et al. 2004). Los primeros trabajos sobre IL-15 no observaron ARNm en linfocitos T (Grabstein, Eisenman et al. 1994; Bamford, Battista et al. 1996). Más tarde, al aumentar la sensibilidad de las técnicas de detección, se describió la presencia de ARNm de IL-15 en linfocitos T (Azimi, Brown et al. 1998). Posteriormente, se describió también la expresión de IL-15 a nivel de proteína en linfocitos T humanos de controles sanos (Neely, Robbins et al. 2001) y en linfocitos T de tejido sinovial de pacientes de artritis reumatoide (Thurkow, van der Heijden et al. 1997). Sin embargo, a pesar de lo anteriormente expuesto, con frecuencia se asume que los linfocitos T humanos de controles sanos no expresan IL-15 (Lodolce, Burkett et al. 2001; Dubois, Mariner et al. 2002; Budagian, Bulanov et al. 2004).

La IL-15 comparte muchas propiedades con la IL-2 (McInnes and Liew 1998). Actúa a través de un receptor heterotrimérico, compuesto por tres cadenas conocidas como:

- Cadena  $\alpha$  (IL-15R $\alpha$ ), subunidad específica responsable de la unión de la IL-15 al receptor. Su afinidad por la IL-15 es extremadamente elevada, por lo que la IL-15 después de ser secretada es secuestrada inmediatamente por el receptor. Este hecho es por lo que raramente se detecta IL-15 en los sobrenadantes de cultivo (Giri, Ahdieh et al. 1994; Dubois, Mariner et al. 2002; Lodolce, Burkett et al. 2002). Se ha demostrado que la IL-15 realiza sus funciones biológicas por contacto celular y no de forma soluble (Rappl, Kapsokafalou et al. 2001; Briard, Brouty-Boye et al. 2002).

- Cadenas  $\beta$  y “ $\gamma$  común”, responsables de transducir la señal iniciada por la unión de la IL-15 a la cadena  $\alpha$  (Giri, Ahdieh et al. 1994; Grabstein, Eisenman et al. 1994). El receptor de la IL-15 comparte las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  con el receptor de la IL-2 (Li, Demirci et al. 2001). Además, los receptores de IL-2 e IL-15 comparten la cadena  $\gamma$  con un grupo más amplio de citoquinas, que incluye a la IL-4, IL-7, IL-9 e IL-21. Por compartir esta cadena, las citoquinas mencionadas se engloban en el “grupo de citoquinas  $\gamma$ ”.

La mayoría de la IL-15 detectada en la superficie celular está unida a IL-15R $\alpha$  y puede estimular en *trans* a células adyacentes portadoras de cadenas  $\beta\gamma$  e IL-15R- $\alpha\beta\gamma$  (Dubois, Mariner et al. 2002). Además, la IL-15 puede encontrarse en la membrana plasmática independiente de su receptor (Budagian, Bulanov et al. 2004; Neely, Epelman et al. 2004). Se ha descrito que los fibroblastos humanos de bazo regulan la diferenciación celular de las células “natural killer” a partir de sus progenitores CD34 a través de la IL-15 de membrana (Briard, Brouty-Boye et al. 2002). Además, los fibroblastos de piel estimulados con TNF $\alpha$  expresan IL-15 de superficie que induce la activación y proliferación de linfocitos T (Rappl, Kapsokafalou et al. 2001).

Existen evidencias experimentales *in vivo* (Ruchatz, Leung et al. 1998; McInnes, Gracie et al. 2003; Ferrari-Lacraz, Zanelli et al. 2004) e *in vitro* (McInnes, al-Mughales et al. 1996; McInnes, Leung et al. 1997) a favor de la implicación de la IL-15 en la patogenia de la AR. Se ha descrito que la IL-15 recluta y activa a los linfocitos T en la membrana sinovial e induce la secreción de TNF $\alpha$  por parte de los macrófagos sinoviales (McInnes, Leung et al. 1997). Es posible detectar cantidades elevadas de IL-15 (~100-1000 pg/ml) en el líquido sinovial reumatoide (McInnes, al-Mughales et al. 1996) así como en la superficie de los fibroblastos de la íntima sinovial (McInnes, al-Mughales et al. 1996; McInnes, Leung et al. 1997; Thirkow, van der Heijden et al. 1997; Harada, Yamamura et al. 1999) y en el suero de pacientes con AR (Gonzalez-Alvaro, Ortiz et al. 2003).

Hasta hace poco era difícil explicar el mecanismo de activación de los linfocitos T CD4 de memoria en la sinovial reumatoide ya que el ambiente de citoquinas se consideró inadecuado para su activación y expansión debido a la escasez de IL-2 (Fox 1997). El descubrimiento de la IL-15 ha resuelto esta incógnita. La IL-15, a diferencia de la IL-2, se expresa en la membrana de monocitos/macrófagos y de fibroblastos sinoviales de AR, y por tanto podría inducir de manera efectiva la proliferación de linfocitos T (Liew and McInnes 2002).

La IL-15 es capaz de activar a los LT en ausencia de antígeno (Lodolce, Burkett et al. 2001); esta activación inducida por citoquinas ocurre *in vivo* independientemente de la interacción del complejo mayor de histocompatibilidad con el receptor de linfocitos T (MHC-TCR) y se conoce como activación inducida por citoquinas (“cytokine-driven”) o activación accidental (“bystander activation”) (Unutmaz, Pileri et al. 1994; Liu, Catalfamo et al. 2002). Los LT así estimulados adquieren la capacidad de activar a macrófagos y a fibroblastos sinoviales, y de ayudar a linfocitos B en la producción de anticuerpos.

La administración de IL-15R $\alpha$  soluble (McInnes, Gracie et al. 2003) o un mutante antagonista IL-15/Fc (Ferrari-Lacraz, Zanelli et al. 2004) previene el desarrollo de artritis inducida por colágeno en ratones y reduce de manera efectiva la inflamación, la hiperplasia sinovial y las erosiones óseas (Ruchatz, Leung et al. 1998). Además, un ensayo clínico fase I-II en humanos utilizando un anticuerpo monoclonal humano anti-IL15 sugiere que la neutralización de la IL-15 en pacientes con AR es segura y efectiva (Baslund, Tvede et al. 2005).

## 4.2 Otras citoquinas.

Los niveles de TNF $\alpha$  e IL-1 son elevados, tanto en el líquido sinovial como en la membrana sinovial, siendo unas de las citoquinas consideradas más relevantes en la AR. Tanto el TNF $\alpha$  como la IL-1, son producidas por monocitos, y la IL-6 es producida por monocitos y fibroblastos. Estas citoquinas estimulan la producción de metaloproteasas, moléculas de adhesión y secreción de otras citoquinas y además contribuyen a la destrucción del cartílago (Lee and Weinblatt 2001). También es importante la participación de quemoquinas como IL-8 y RANTES (“Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted” también denominada CCL5), que atraen células inflamatorias, y de VEGF (“vascular endothelial growth factor”), que estimula la angiogenesis. Por otro lado, en la sinovial reumatoide existen citoquinas antiinflamatorias como IL-10, receptores señuelo solubles y receptores solubles de las citoquinas (Edwards 2005).

La combinación del elevado número de citoquinas (como TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-15) en la sinovial inflamada parece tener un efecto sinérgico. Se ha sugerido la existencia de mecanismos complejos de regulación autocrina local en los cuales, las citoquinas solubles y de membrana, junto con moléculas de adhesión, están implicadas en determinar el equilibrio en la síntesis de citoquinas pro- y anti-inflamatorias (i.e., TNF $\alpha$ /IL-10) (McInnes and Schett 2007).

## 4.3 TRAIL.

El TRAIL (“Tumor necrosis factor (TNF)–related apoptosis inducing ligand”), es miembro de la familia del TNF que induce selectivamente apoptosis en células tumorales, con consecuencias mínimas en las células normales (Walczak, Miller et al. 1999). El TRAIL posee 5 receptores (TRAIL-R). El TRAIL-R1 (DR4) y el TRAIL-R2 (DR5) poseen dominios citoplasmáticos de muerte que reclutan FADD (“Fas-associated via death domain”) e inician el proceso de apoptosis a través de la activación de la caspasa 8. El TRAIL-R3, unido a la membrana plasmática a través de glicofosfatidilinositol, y el TRAIL-R4, proteína de membrana tipo I, no desencadenan muerte celular (Sheridan, Marsters et al. 1997). El quinto es la osteoprotegerina (OPG) mencionada anteriormente (Emery, McDonnell et al. 1998). Los receptores TRAIL-R3, TRAIL-R4 y OPG actúan como receptores señuelo bloqueando la apoptosis mediada por el TRAIL y sus niveles de expresión pueden modificar la susceptibilidad a los efectos citotóxicos del TRAIL (Sheridan, Marsters et al. 1997).

Se ha detectado niveles elevados de TRAIL-R2 (DR5) en tejidos cancerosos (Walczak, Miller et al. 1999), tejido sinovial y fibroblastos de AR, por lo que estos son susceptibles de sufrir apoptosis a través de DR5 (Ichikawa, Liu et al. 2003). El tejido sano y las células sinoviales de artrosis no expresan DR5, por lo que son resistentes a la apoptosis mediada por DR5. Por tanto, DR5 podría ser un marcador selectivo de células sinoviales de AR (Ichikawa, Liu et al. 2003).

En estudios en ratones se ha observado que el TRAIL o sus receptores de muerte podrían ser una buena diana terapéutica para la AR: un anticuerpo monoclonal (AcMc) anti-DR5 previene la artritis erosiva en un modelo murino en el que se injerta tejido sinovial de pacientes con AR (Ichikawa, Liu et al. 2003); los ratones deficientes para TRAIL tienen mayor susceptibilidad a la artritis inducida por colágeno (AIC) (Lamhamedi-Cherradi, Zheng et al. 2003); y un bloqueo crónico del TRAIL en ratones con AIC agrava la artritis, mientras que la transferencia del gen TRAIL intraarticular mejora la enfermedad (Song, Chen et al. 2000). La administración de TRAIL en humanos tiene varios efectos secundarios, como su hepatotoxicidad (Jo, Kim et al. 2000), que no se observa en el ratón. Este hecho podría explicarse por unos distintos niveles de expresión de los diferentes receptores del TRAIL en nuestra especie (Sheridan, Marsters et al. 1997; Emery, McDonnell et al. 1998; Ichikawa, Liu et al. 2003). Por tanto, la administración de un AcMc agonista anti-DR5 que sólo induce apoptosis en células DR5 no afecta a hepatocitos sanos, y podría ser una herramienta terapéutica útil para la AR (Ichikawa, Liu et al. 2001; Ichikawa, Liu et al. 2003).

## 5. BIOLOGÍA DEL LINFOCITO T.

La proliferación homeostática *in vivo* de los linfocitos T responde a la necesidad de mantener constante su concentración total en animales adultos, de modo que los linfocitos T maduros, como población, tienen una esperanza de vida indefinida. La persistencia a largo plazo de los linfocitos T es el resultado de un delicado equilibrio entre longevidad y proliferación celular (Sprent 1993). Estudios cinéticos en ratón y en humanos sanos han demostrado que los linfocitos T proliferan *in vivo*, y la subpoblación de linfocitos T de memoria ( $LT_M$ ) se divide a mayor velocidad que los linfocitos vírgenes o *naïve* ( $LT_N$ ) (Ku, Murakami et al. 2000; Macallan, Wallace et al. 2004). Aunque el contacto con un antígeno es capaz de preservar el número de linfocitos T de memoria, se ha observado que no es del todo esencial. De hecho, las células T de memoria pueden sobrevivir y proliferar en presencia de ciertas citoquinas y en ausencia de antígeno (Lau, Jamieson et al. 1994; Sprent, Tough et al. 1997; Murali-Krishna, Lau et al. 1999; Swain, Hu et al. 1999). Se sabe que, *in vitro*, los linfocitos T humanos son capaces de sobrevivir durante largos periodos de tiempo y que la longevidad en cultivo depende de la densidad celular (Pilling, Akbar et al. 2000).

Se ha descrito que, en ratones, la IL-7 y la IL-15 controlan la supervivencia y proliferación de los linfocitos T CD8 de memoria en ausencia de antígeno (Schluns, Kieper et al. 2000); por el contrario, los linfocitos T CD4 vírgenes o *naïve* y los linfocitos T CD4 de memoria de los ratones requieren IL-7 junto con estimulación antigénica (Seddon and Zamoyska 2002; Seddon, Tomlinson et al. 2003), pero no responden a la IL-15. Sin embargo, es importante destacar que los linfocitos T CD4 humanos proliferan en presencia de IL-15 aun cuando no esté presente un

antígeno, lo cual sugiere que la acción de la IL-15 sobre los linfocitos T CD4 de memoria es diferente en ratones en comparación con los humanos (Prlic, Lefrancois et al. 2002).

## ***OBJETIVOS***

Sobre la base de los antecedentes expuestos, nos propusimos estudiar la implicación de las interacciones celulares en la patogenia de la AR (con dos objetivos fundamentales:). Esto se desglosó en dos objetivos principales:

1. Estudiar el efecto que producen los fibroblastos sinoviales sobre los linfocitos T de pacientes con artritis reumatoide y viceversa, en cuanto a la expresión de moléculas de adhesión y la producción de citoquinas, lo cual puede conducir a perpetuar la inflamación articular.
2. Estudiar el potencial osteoclastogénico de los linfocitos T de pacientes con artritis reumatoide en monocitos autólogos, y determinar las citoquinas implicadas en este proceso.

Durante el desarrollo del trabajo surgieron dos preguntas adicionales alejadas de los objetivos principales:

3. Estudiar la expresión de TRAIL-R2 en los fibroblastos que crecen a partir del líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y su susceptibilidad a la apoptosis inducida por un anticuerpo monoclonal agonista anti-TRAIL-R2.
4. Estudiar la expresión constitutiva de IL-15 y su receptor en los linfocitos T humanos y su actividad biológica.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***



## **1. CULTIVOS CELULARES.**

Los estudios fueron aprobados por el Comité Ético del Hospital Universitario La Paz de Madrid. Se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos, linfocitos T y monocitos humanos. Los cultivos se realizaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa, en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY Carlsbad, CA). Las placas y los frascos de cultivo fueron de Corning (Cambridge, MA).

### **1.1 Cultivos primarios.**

#### **1.1.1 Purificación de fibroblastos sinoviales.**

Los fibroblastos sinoviales de artritis reumatoide (FSAR, n=10) y fibroblastos sinoviales de artrosis (FSA, n=10) se aislaron de la membrana sinovial de pacientes sometidos a sinovectomía o artroplastía. Los fibroblastos de piel (FP, n=5) se obtuvieron a partir de biopsias de voluntarios sanos.

El tejido fue disociado mecánicamente y sometido a una digestión con colagenasa tipo I al 0,2% (Worthington Biochemical, Freehold, NJ) durante 30 minutos a 37°C con agitación. Las células se cultivaron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> y al alcanzar una confluencia del 95% se tripsinizaron (0,05% tripsina/0,53 mM EDTA; Invitrogen Life Technologies), y se volvieron a sembrar diluidas a la mitad. Los fibroblastos se utilizaron entre el tercer y el quinto pase. La técnica estándar para el cultivo de fibroblastos ha demostrado que a partir del segundo-tercer pase no existe contaminación por macrófagos, aún así lo comprobamos mediante citometría de flujo. Encontramos una población homogénea positiva para la expresión del marcador de fibroblastos Thy-1 (CD90) (Saalbach, Haustein et al. 2000) y negativa para CD1, CD3, CD19, CD14, CD80 y CD86 a partir del tercer pase.

#### **1.1.2 Purificación de fibroblastos de líquido sinovial.**

Las células mononucleares del líquido sinovial se aislaron por gradiente de densidad en Ficoll-Hypaque (Amersham, Uppsala, Suecia). Se resuspendieron en medio de cultivo y se sembraron en frascos de 25 cm<sup>2</sup>. Después de 24 horas, las células no adheridas se eliminaron y se cambió el medio de cultivo; en ese momento, la mayoría de las células adheridas tenían aspecto de macrófago. Al cabo de unos días, se empezaron a observar células con forma alargada en algunos cultivos. La velocidad de crecimiento de estas células variaba según los pacientes, de modo que a los 7–14 días ocupaban la placa por confluencia. Al tercer pase, las células se inmunofenotiparon del modo descrito en el apartado anterior, siendo el 100% de ellos fibroblastos.

### 1.1.3 Purificación de Linfocitos T.

Los leucocitos al madurar adquieren y/o eliminan proteínas de superficie llamadas antígenos leucocitarios. Se les denomina “CD” (“cluster of differentiation”) y su conjunto define a las distintas poblaciones de leucocitos. Gracias a ellos fuimos capaces de aislar y diferenciar a los linfocitos T (LT) y a sus subpoblaciones. Por ello los detallamos a continuación (Sallusto, Lenig et al. 1999):

- LT totales: CD3+
- LT colaboradores (“helper”): CD3+, CD4+
- LT citotóxicos: CD3+, CD8+
- LT vírgenes o *naïve* (LT<sub>N</sub>): CD3+, CD45RA+, CD11a bajo, CD95-
- LT de Memoria (LT<sub>M</sub>): CD3+, CD45RO+, CD11a alto, CD95+
- LT de Memoria Central (LT<sub>MC</sub>): CD3+, CD45RO+, CD27+, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD11a alto, CD95+
- LT de Memoria Periférica o Efectores (LT<sub>MP</sub>): CD3+, CD45RO+, CD27-, CD28-, CD62L-, CCR7-, CD11a alto, CD95+

Las células mononucleares de sangre periférica y del líquido sinovial se separaron por gradiente de densidad en Ficoll-Hypaque. Los LT se aislaron en un Automacs (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) utilizando un kit de inmunoselección magnética negativa que contiene anticuerpos frente a CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 y CD235a (Miltenyi Biotec). El porcentaje de células positivas para CD3 resultó superior al 99%, indicativo de una alta pureza en la población. A partir de los LT totales se aislaron los LT<sub>N</sub> y los LT<sub>M</sub> por inmunoselección negativa usando microesferas magnéticas anti-CD45RO y anti-CD45RA respectivamente. A partir de los LT<sub>M</sub>, separamos los LT<sub>MC</sub> y los LT<sub>MP</sub> mediante inmunoselección positiva o negativa respectivamente utilizando un anticuerpo anti-CD62L (BD Pharmingen) seguido de un anticuerpo anti-ratón marcado con microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec). La pureza de todas las poblaciones fue superior al 97%.

### 1.1.4. Purificación de monocitos.

Los monocitos se purificaron en el autoMACS con un kit de inmunoselección magnética negativa que contiene anticuerpos frente a CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 y CD235a (Miltenyi Biotec), obteniendo una pureza en la separación superior al 95% de CD14+.

## 1.2 Condiciones de cocultivo.

### 1.2.1 Cocultivo entre fibroblastos / linfocitos T.

Se ha descrito que los LT cocultivados con FSAR alogénicos no se activan: no se observan cambios en su morfología, no se induce la expresión de CD40L y no se detecta ARNm para IL-2 (Yamamura, Gupta et al. 2001). Parece que esto se debe a que los FSAR muestran una expresión escasa o nula de CD80 y CD86 (ligandos de CD28) (Tsai, Diaz et al. 1996). Todas las

condiciones experimentales se realizaron por duplicado siendo la variación entre ellas inferior al 5%. Los fibroblastos se sembraron en placas de seis pocillos a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/pocillo. Después de 24 horas, se añadieron los LT recién separados ( $2 \times 10^6$  células/pocillo) y fueron recogidos con PBS frío a las 6, 24, 48, 72, 96 y 120 horas. Posteriormente se disgregaron los fibroblastos de la placa con tripsina a 37°C, excepto para determinar la expresión de superficie de IL-15 que fue necesario utilizar 5 mM EDTA en PBS a 4°C con el fin de preservar la unión de IL-15 a la membrana celular.

Los experimentos preliminares se realizaron con distintas concentraciones de LT ( $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  por pocillo) y se observó una menor respuesta en los cocultivos donde la concentración era igual o superior a  $3 \times 10^6$  LT/pocillo, debido a la baja proporción estequiométrica entre el número de LT y las citoquinas producidas por los fibroblastos. Por tanto determinamos que la concentración adecuada para nuestro estudio era de  $2 \times 10^6$  LT/pocillo.

### **1.2.2 Cocultivo entre linfocitos T / monocitos.**

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y la variación entre ellos fue menor del 5%. La relación celular en todos los cocultivos fue de 1:4 monocitos:LT. Es decir, en placas de 24 pocillos, con una superficie de cultivo de  $1,9 \text{ cm}^2$  por pocillo, se sembraron a una concentración de  $5 \times 10^5$  monocitos :  $2 \times 10^6$  LT; mientras que en placas portaobjetos de 16 pocillos de “BD BioCoat Osteologic Bone Cell Culture System” (BD Biosciences, Bedford, MA) con una superficie de cultivo de  $0,32 \text{ cm}^2$  por pocillo, se sembraron a una concentración de  $1 \times 10^5$  monocitos :  $4 \times 10^5$  LT. Los cocultivos se mantuvieron durante 14 días. El medio de cultivo se cambió cada 4 días de la siguiente forma: se retiró el medio de cultivo y se centrifugó; los LT que permanecieron en el fondo se resuspendieron en 50% de medio nuevo y 50% del sobrenadante que habíamos retirado previamente. En el día 14, los sobrenadantes se recogieron, se filtraron y se guardaron a  $-80^\circ\text{C}$  para usarlos posteriormente en ELISAs y en experimentos de cocultivo.

### **1.2.3 Contacto celular directo.**

#### **• Sistema con soportes permeables.**

En algunos casos, los experimentos de cocultivo se realizaron utilizando soportes permeables de  $0,4 \mu\text{m}$  (“transwell” Corning Costar Corporation) con el fin de evaluar la importancia del contacto celular directo en los resultados observados. Este sistema crea dos compartimentos de cultivo gracias a una matriz porosa que separa la parte superior del pocillo de la inferior, de forma que se impide el contacto directo entre las células que están en los distintos compartimentos permitiendo el flujo del medio de cultivo con el consiguiente intercambio de factores solubles.

#### **• Fijación de los fibroblastos sinoviales con paraformaldehído (PFA).**

Los fibroblastos se sembraron en placas de 6 pocillos y al llegar casi al 100% de confluencia, se fijaron con PFA al 2% frío durante 10 minutos en hielo. A continuación, se lavaron con PBS frío para eliminar cualquier residuo de PFA antes de añadir los LT.

## **2. CITOMETRÍA DE FLUJO.**

Para la detección de citoquinas intracelulares se añadió 10µl/ml de brefeldina A (Sigma-Aldrich) durante las últimas 6 horas del cultivo con el fin de paralizar el tráfico intracelular y la secreción de citoquinas. Ello no fue necesario para la detección de IL-15 intracelular debido a las propiedades específicas de esta citoquina. A continuación, las células fueron recogidas, lavadas con suero fetal bovino al 2% y acida sódica al 0,01% diluidos en tampón fosfato salino (PBS/2% FBS/0.01% NaN<sub>3</sub>) y permeabilizadas usando la solución “FACS permeabilizing solution 2” (BD Pharmingen) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para las tinciones de superficie no se añadió brefeldina A, se omitió la permeabilización de la membrana y directamente se procedió a realizar tinciones en uno o dos pasos.

Para las tinciones en dos pasos, las células se lavaron PBS/2% FBS/0,01% NaN<sub>3</sub> y se incubaron durante 1 hora a 4°C con el anticuerpo monoclonal (AcMc) primario específico de cada citoquina o su isotipo control correspondiente. Después se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a fluorocromo durante 30 minutos a 4°C. Tras volverlas a lavar, se fijaron con PFA al 1% y se analizaron en el citómetro de flujo FACSCalibur usando el programa CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los AcMc de ratón anti-IL-15, anti-IL-2/IL-15Rβ, anti-cadena común γ, anti-IL-15Rα, anti-RANKL, anti-DR5 o sus isotipos controles IgG fueron de R&D Systems. El anticuerpo secundario de cabra anti-IgG frente a ratón conjugado con Alexafluor488 fue de Molecular Probes (Eugene, OR).

Para las tinciones en un paso, las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C con el anticuerpo conjugado directamente con fluorocromo. Todos estos anticuerpos conjugados fueron de BD Pharmingen (San Jose, CA): con FITC “fluorescein isothiocyanate” (anti-CD90, anti-IFNγ, anti-CD25, anti-CD11a, anti-CD4, anti-CD14, anti-CD62L, anti-CD45RA, anti-HLA-DR y anti-CD40L), con PE “phycoerythrin” (anti-IL-6, anti-IL-8, anti-TNFα, anti-CD54, anti-CD69, anti-CD8, anti-CTLA-4, anti-CD19, anti-CD45RO, anti-CD62L y anti-CD14), con PerCP “peridinin chlorophyll protein” (anti-CD3 y anti-CD45) o con APC “allophycocyanin” (anti-CD45RA, anti-CD45RO, anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8). El AcMc anti-IL-17 fue de R&D Systems y se conjugó con FITC usando un kit de Pierce (Rockford, IL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La intensidad de fluorescencia media (IFM) se calculó restando a la intensidad de fluorescencia media observada en células marcadas con el anticuerpo de interés, la intensidad de fluorescencia media de las células marcadas con el isotipo control.

### 3. EXTRACCIÓN DE ARNm Y RT-PCR CUANTITATIVA.

Para la extracción y purificación del ARN total de las células se empleó el kit “RNeasy mini” (Qiagen, Hilden, Alemania) incluyendo un tratamiento con la enzima ADNasa en columna siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante. La integridad del ARN se determinó visualizando los ARN ribosomales 28S y 18S con luz ultravioleta mediante un gel de electroforesis de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. A continuación se realizó la retrotranscripción (RT) con 1 µg de ARN total para obtener ADN complementario (ADNc), mediante el kit “Advantage RT for PCR” (BD-Clontech, Palo Alto, CA). Se utilizaron alícuotas de 1 µl del producto de la retrotranscripción para analizar la expresión de diferentes citoquinas y sus receptores mediante PCR cuantitativa en tiempo real en el LightCycler™ PCR (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) usando el kit “FastStart DNA Master SYBR Green I” (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Los oligonucleótidos que empleamos para reconocer las diferentes citoquinas y sus receptores (tamaño del producto en pares de bases (pb)) fueron:

- IL-6 (201 pb): directo, 5'-CAG CTA TGA ACT CCT TCT CCA CAA GC-3' y reverso, 5'-CTG AGA TGC CGT CGA GGA TGT ACC G-3'
- IL-8 (292 pb): directo, 5'-ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT-3' y reverso, 5'-TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCT C-3'
- IL-15 (643/524 pb): directo 5'-GGA TTT ACC GTG GCT TTG AGT AAT GAG-3' y reverso 5'-CAA TCA ATT GCA ATC AAG AAG TG-3'
- IL-15Rα (543/444 pb): directo 5'-GGA ATT CAT CAC GTG CCC TCC CCC CAT G-3' y reverso 5'-CGG GAT CCT CAA GTG GTG TCG CTG TGG CCC TG-3'
- IL-2/IL-15Rβ (531 pb): directo 5'-ACC TCT TGG GCA TCT GCA GC-3' y reverso 5'-CGT CTC CAG GCA GAT CCA TT-3'
- Cadena común γ (420 pb): directo 5'-CCA GAA GTG CAG CCA CTA TC-3' y reverso 5'-TCA CTC CAA TGC TGA GCA CT-3'
- IL-17 (416 pb): directo, 5'-TGG AGG CCA TAG TGA AGG-3' y reverso, 5'-GGC CAC ATG GTG GAC AAT-3'
- IFNγ (307 pb): directo 5'-TGC AGG TCA TTC AGA TGT AG-3' y reverso, 5'-AGC CAT CAC TTG GAT GAG TT-3'
- TNFα (280 pb): directo, 5'-ATG AGC ACT GAA AGC ATG ATC CGG-3' y reverso, 5'-CTA CAA CAT GGG CTA CAG GCT TGT-3'
- β-actina (225 pb): directo 5'-GAG CGG GAA ATC GTG CGT GAC ATT-3' y reverso, 5'-GAA GGT AGT TTC GTG GAT GCC-3'

La amplificación del producto de PCR se monitorizó midiendo la fluorescencia del colorante SYBR Green I. Los valores de expresión se normalizaron de acuerdo a la expresión del gen de la  $\beta$ -actina (control externo estándar), amplificado a partir de las mismas muestras de ADNc. Cada muestra se midió por triplicado y los resultados obtenidos se analizaron mediante el programa LightCycler Software version 3.5.3 (Roche Diagnostics). Los productos de PCR se identificaron analizando la curva de melting y como confirmación adicional, con un gel de electroforesis. En experimentos preliminares también se analizaron por secuenciación directa (ABI PRISM310 Genetic Analyzer, Perkin–Elmer Applied Biosystems, Norwalk, CT, USA).

La cantidad de ARNm específico en cada muestra se determinó utilizando una curva estándar para cada gen. Esta curva relativa se preparó por duplicado con diluciones seriadas del ADNc de la muestra con mayor nivel de expresión del gen en estudio y se amplificó al mismo tiempo que las muestras problema.

#### **4. ELISA (“ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY”).**

Los niveles de las distintas citoquinas en los sobrenadantes de cultivos se determinaron mediante kits comerciales de ELISA. Para estudiar la presencia de IFN $\gamma$ , OPG, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15 e IL-17 en sobrenadantes de cultivo libres de restos celulares utilizamos kits de ELISA “DuoSet” (R&D Systems). Para el RANKL utilizamos un kit de Biomedica Medizinprodukte (Vienna, Austria). Todos los ELISAs se realizaron siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

#### **5. EXPERIMENTOS DE INHIBICIÓN.**

Utilizamos los siguientes anticuerpos neutralizantes para realizar los experimentos de inhibición funcional:

- AcMc neutralizantes de ratón frente a CD54, IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-15, IL-2/IL-15R $\beta$ , IL-17, TNF $\alpha$ , (R&D Systems), CD11a/LFA-1, CD69 (BD Pharmingen) o isotipo control inespecífico (BD Pharmingen o R&D Systems) incubados a una concentración de 10  $\mu$ g/ml. Además, como control de unión a superficie (“binding control”) utilizamos un anti-HLA clase I (clon W6/32, Sigma, St. Louis, MO) incubado también a una concentración de 10  $\mu$ g/ml.
- un anticuerpo policlonal neutralizante de cabra frente a IL-15R $\alpha$  (R&D Systems) o  $\gamma$ -globulina de cabra incubados a una concentración de 1  $\mu$ g/ml.
- un constructo quimérico IL-15R $\alpha$ -Fc (R&D Systems) o  $\gamma$ -globulina humana normal incubados a una concentración de 100 ng/ml.

- un constructo quimérico OPG-Fc (R&D Systems) o  $\gamma$ -globulina humana normal incubados a una concentración de 1  $\mu$ g/ml.

## **6. EFECTO DEL TRATAMIENTO *in vivo*.**

Algunos pacientes donaron sangre por segunda vez al año del diagnóstico o cuando la actividad de la enfermedad se encontraba en remisión completa, definida por una puntuación de la actividad de la enfermedad (DAS28) menor de 2,6 (Balsa, Carmona et al. 2004). Para que las variaciones experimentales fueran mínimas, los cocultivos se establecieron con los mismos controles utilizados en el experimento anterior al tratamiento. Los resultados de cada paciente se compararon con los resultados obtenidos antes de iniciar el tratamiento.

## **7. DETERMINACIÓN DE FENOTIPO Y ACTIVIDAD OSTEOCLÁSTICA.**

La diferenciación osteoclastogénica en cocultivos de monocitos y linfocitos T se determinó a los 14 días del inicio del cocultivo. Las células no adherentes se eliminaron, y las células adherentes se tiñeron con la técnica de fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP “tartrate-resistant acid phosphatase”; Sigma, St. Louis, MO) en la cual los núcleos se contratiñen con hematoxilina. Las preparaciones se observaron al microscopio óptico (Olympus IX-51; Olympus, Hamburgo, Alemania), las fotografías de los cultivos se hicieron con una cámara digital Coolpix 4500 (Nikon, Tokio, Japón) y las imágenes se transfirieron con el software NikonView 5. Se contabilizó como osteoclastos aquellas células TRAP+ que poseen 3 o más núcleos. Los resultados se han mostrado como el número de células multinucleadas TRAP+ por pocillo.

La actividad resortiva de los osteoclastos se determinó en cocultivos establecidos sobre portaobjetos recubiertos de una matriz de hidroxiapatita similar al hueso (“BD BioCoat Osteologic calcium hydroxyapatite-coated slides”). A los 14 días iniciado el cocultivo, las células fueron eliminadas de esta superficie con hipoclorito sódico al 5%. La placa de hidroxiapatita posteriormente fue lavada con agua destilada, secada al aire y examinada con el microscopio óptico. El área de erosiones se midió con el programa Photoshop 7.0 (Adobe Systems, San Jose, CA) y el porcentaje de área resorbida se calculó dividiendo el total del área de erosiones por el área total de la superficie.

## **8. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN.**

La proliferación de los LT fue determinada por citometría de flujo mediante el análisis de la fluorescencia emitida por el CFSE (Molecular Probes). Las células recién aisladas fueron

incubadas durante 15 minutos a 37°C, antes de iniciar el cultivo, con CFSE a una concentración final de 8mM.

## **9. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN FIBROBLASTOS.**

Al observar crecimiento de fibroblastos en el cultivo de las células del líquido sinovial (FLS), nos propusimos estudiar si estos FLS expresaban TRAIL-R2 (DR5) y si este era capaz de inducir apoptosis. Para detectar la molécula en la membrana celular realizamos inmunofluorescencias analizadas por el citómetro de flujo como se ha descrito anteriormente.

Para estudiar si el DR5 de membrana de los FLS era funcional, comprobamos la susceptibilidad a la apoptosis inducida por un AcMc de ratón con función agonista del DR5 humano (clon 71093; R&D Systems) mediante varios métodos: bioensayos de actividad metabólica (Alamar Blue), diferenciación morfológica de las células viables y las apoptóticas (marcaje con anexina V/yoduro de propidio) y activación de caspasas (immunoblot).

Los fibroblastos se sembraron en diversas superficies dependiendo del estudio a realizar y cuando los cultivos mostraron una confluencia del 90%, se cambió el medio y se añadió el anticuerpo anti-DR5 con un rango de dosis de 10 ng/ml a 100 ng/ml. Este anticuerpo es capaz de inducir apoptosis en células tumorales sin la necesidad de inducir reagrupamiento de receptores (“crosslinking”) con un anticuerpo secundario y no reacciona de forma cruzada con los receptores TRAIL-R1, TRAIL-R3, TRAIL-R4 o DcR3. Además, como control positivo utilizamos un AcMc anti-Fas a 50 ng/ml (clon DX2; R&D Systems) y como control negativo el correspondiente AcMc isotipo control. Para los ensayos donde se inhibieron las caspasas, los fibroblastos se cultivaron con el anticuerpo anti-DR5 en presencia o ausencia del inhibidor general de caspasas Z-VAD-FMK (20 nM; BioRad, Hercules, CA).

### **9.1 Bioensayos de actividad metabólica.**

Los fibroblastos se sembraron en placas de 96 pocillos en fondo plano a 1.000 células/pocillo por triplicado. La viabilidad celular se determinó con ensayos de Alamar Blue (Serotec, Oxford, UK) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron con los anticuerpos expuestos en el epígrafe anterior al mismo tiempo que con el Alamar Blue al 10% (v/v). La cuantificación se realizó a varios tiempos en un espectrofluorímetro a las longitudes de onda de excitación y emisión respectivamente de 560 nm y 590 nm (Victor<sup>2</sup> Wallac 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer, Turkin, Finlandia). Los resultados se han presentado como el porcentaje de supervivencia en relación con las células control sin tratar.



### **9.2 Diferenciación morfológica de las células viables y apoptóticas.**

La inmunofluorescencia anexina V/yoduro de propidio nos permite diferenciar las células viables, de las células apoptóticas tempranas y de las apoptóticas tardías. Para ello, sembramos los fibroblastos sobre unos cubreobjetos redondos situados en placas de 24 pocillos a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/pocillo. Los cultivamos con los anticuerpos descritos anteriormente y posteriormente los marcamos con anexina V/yoduro de propidio para observar las características morfológicas de apoptosis en un microscopio de fluorescencia.

### **9.3 Activación de caspasas.**

Los fibroblastos se sembraron en placas de 6 pocillos a  $1 \times 10^6$  células/pocillo por duplicado. La acción de la polimerasa poliADP-ribosa (PARP) se detectó por lisados celulares por inmunoblot (Casiano, Martin et al. 1996) usando un AcMc específico de Laboratorios PharMingen Transduction (San Diego, CA).

## **10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.**

Las comparaciones entre grupos se hicieron mediante la U de Mann-Whitney. Las muestras pareadas se compararon mediante el test de los signos de Wilcoxon. Aplicamos la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones cuando fue necesario.

## **11. PACIENTES.**

En este epígrafe describimos las características más relevantes de los pacientes que han intervenido en cada estudio.

Los pacientes con artritis reumatoide fueron diagnosticados según criterio del Colegio Americano de Reumatología, es decir, si cumplían al menos 4 de los criterios de la revisión de 1987 (Arnett, Edworthy et al. 1988). Se incluyó solamente pacientes con AR de reciente comienzo, con una duración inferior a 6 meses y que no hubiesen recibido nunca ningún fármaco modificador de enfermedad (FAME) o corticoesteroide.

### **11.1 Características de los pacientes con AR de inicio que donaron sangre periférica para obtener LT en el estudio de la relación entre FSAR y LT.**

- Los pacientes con AR de inicio (n=20; 7 hombres y 13 mujeres) tenían una edad comprendida entre los 18 y 80 años (media 51,42); el 75% era factor reumatoide positivo; en la primera evaluación la duración de los síntomas fue de 2 a 26 semanas (media 11,53) y el DAS28 estaba comprendido entre 4,71 y 7,49 (media 5,98).

- Pacientes con AR de inicio en remisión completa. Cinco de los pacientes anteriores (2 hombres y 3 mujeres) donaron sangre periférica por segunda vez cuando habían alcanzado la remisión completa, definida por un DAS28 inferior al 2,6. Los pacientes habían recibido metotrexato (MTX) oral 15 mg semanalmente, excepto un paciente que recibía 25 mg a la semana. Además 4 de los 5 pacientes recibían prednisona, 2,5 mg diariamente. Los pacientes tenían una edad media de 39,6 años; el 80% eran factor reumatoide positivo en la primera evaluación; la media del DAS28 antes de iniciar el tratamiento fue de 5,53 y en el segundo análisis fue de 1,95.

### **11.2 Características de los pacientes con AR de inicio que donaron sangre periférica para obtener LT y monocitos en el estudio de la osteoclastogénesis.**

- Los pacientes con AR de inicio (n=20; 5 hombres y 15 mujeres) tenían una edad comprendida entre los 18 y 86 años (media 46,9); el 75% era factor reumatoide positivo; en la primera evaluación la duración de los síntomas fue de 2 a 26 semanas (media 11,40) y el DAS28 estaba comprendido entre 4,71 y 7,73 (media 6,05).

- Pacientes con AR de inicio que donaron sangre periférica por segunda vez al año del diagnóstico (n=16). Los pacientes habían recibido MTX oral a dosis de 12,5–25 mg/semana; además 7 de ellos recibían prednisona oral 2,5–5 mg/día, y 2 pacientes leflunomida oral a 10 mg/día en combinación con MTX y prednisona.

Las radiografías posteroanteriores de manos y pies fueron evaluadas por dos reumatólogos que desconocían los resultados experimentales según el método descrito por van der Heijde y col. (van der Heijde, van Riel et al. 1989). La variación interobservador fue de 0,89, mientras que la variación intraobservador fue de 0,93 y 0,88. Se compararon los resultados de cada paciente con los obtenidos antes de iniciar el tratamiento.

### **11.3 Controles experimentales.**

Como control positivo se utilizó el líquido sinovial que se obtuvo de 20 pacientes con AR estable, los cuales seguían en tratamiento con MTX oral y bajas dosis de prednisona. Como control negativo, se extrajo sangre periférica de 20 voluntarios sanos pareados.

### **11.4 Características de los pacientes con diferentes artropatías que han donado líquido sinovial para la obtención de fibroblastos.**

En la siguiente tabla se muestran los datos de los pacientes en el momento de la obtención del líquido sinovial:

Patología (Número de muestras)	Edad en años (media); Sexo	Patología activa (media en años)	Tratamiento	Leucocitos / mm <sup>3</sup> (media)	% Neutrófilos (media)
<b>Artritis Reumatoide</b> (50)	20-85 (54); 13 H/37 M	4 meses - 20 años (8.5)	50: MTX oral 34: bajas dosis de prednisona (2.5–7.5 mg) 30: AINEs	2.200–18.000 (7.430)	70–86 (77)
<b>Artropatías seronegativas</b> (30)	28–62 (48); 21 H/9 M	1–15 años (7.2)	21: MTX oral 9: sulfasalazina	3.500–25.000 (10.550)	73–82 (75)
<b>Artrosis</b> (40)	50–87 (67); 16 H/24 M	2–8 años (5)	21: AINEs.	330–1.120 (650)	0–5 (1)
<b>Monoartritis</b> (20)	25–80 (47) ; 8 H/12 M	2.5–10 años (6)		2.530–10.310 (6.350)	71–76 (74)

**Tabla 1: Datos de los pacientes con distintas artropatías en el momento de la obtención del líquido sinovial y el recuento celular en el líquido sinovial.** Un 78% de los pacientes con artritis reumatoide fueron positivos para el factor reumatoide, y 40 de ellos tenían enfermedad erosiva; el rango de DAS28 fue de 3.2–6.2 (media 4.2). Todas las rodillas de los pacientes con artritis reumatoide mostraron signos de sinovitis activa, al igual que en las artropatías seronegativas, mientras que en la artrosis, todas las articulaciones carecían de signos inflamatorios y no existía evidencia de otras artropatías. Abreviaturas: H (hombre) y M (mujer). AINEs: medicamentos antiinflamatorios no esteroideos

### 11.5 Características de los sujetos sanos que donaron sangre periférica para obtener LT en el estudio de la IL-15.

Se extrajo sangre periférica de 20 voluntarios sanos (7 hombres y 13 mujeres) con un rango de edad de 23-42 años (media 25 años).

## ***RESULTADOS***

## **A. INTERACCIONES CELULARES EN LA PATOGENIA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE.**

### **A1. IMPLICACIÓN DE LAS INTERACCIONES ENTRE LOS LINFOCITOS T Y FIBROBLASTOS SINOVIALES EN LA ARTRITIS REUMATOIDE.**

Inicialmente estudiamos las modificaciones inducidas por las interacciones celulares entre los FSAR y los LT en la expresión de moléculas de superficie y citoquinas implicadas en la activación de cada uno de estos dos tipos celulares en la AR.

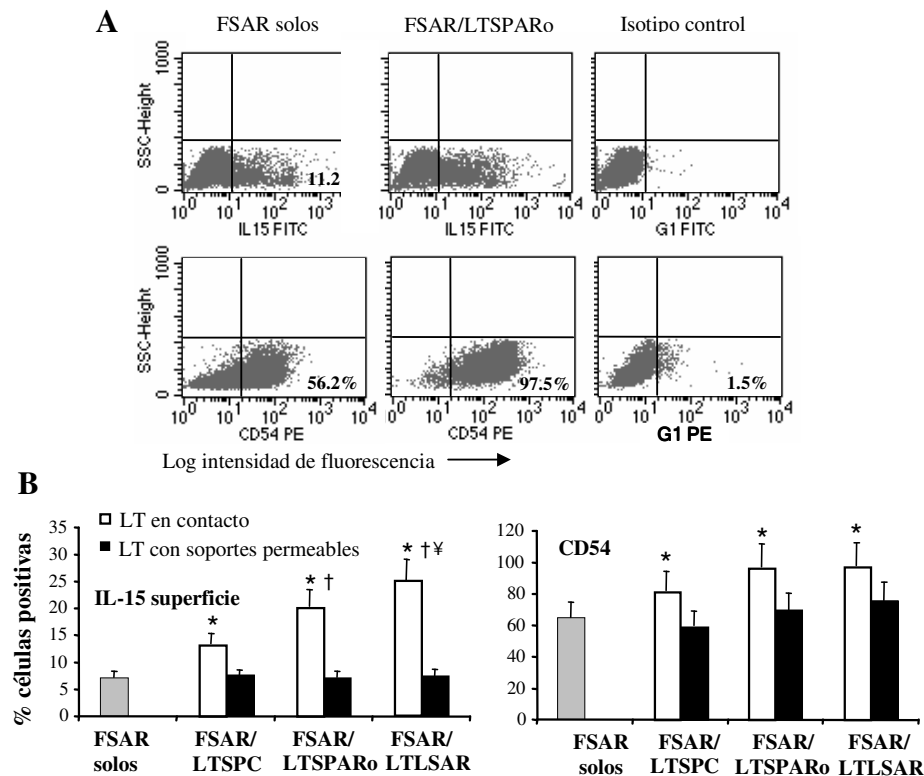
#### **1. LOS LINFOCITOS T ACTIVAN A LOS FIBROBLASTOS SINOVIALES EN EL COCULTIVO, INDUCIENDO UN AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.**

##### **1.1 Efecto de los linfocitos T sobre la expresión de IL-15 y CD54 de membrana en los fibroblastos sinoviales.**

Por citometría de flujo observamos que los FSAR expresan constitutivamente IL-15 de membrana y esta expresión aumentó progresivamente al cocultivar los FSAR con linfocitos T de sangre periférica (SP) de pacientes con AR de inicio (LTSPARo). De la misma forma observamos que la expresión de CD54 (ICAM-1) en los FSAR aumentó rápidamente al iniciarse el cocultivo, alcanzando un máximo a las 24 horas (Fig. 5A).

El aumento de expresión de CD54 e IL-15 en la superficie de los FSAR fue significativamente inferior en los cocultivos con linfocitos T de sangre periférica de sujetos sanos o controles (LTSPC) y significativamente superior en los cocultivos con linfocitos T de líquido sinovial (LS) de pacientes con AR establecida (LTLSAR), en comparación con los cocultivos realizados con LTSPARo. Es decir, los LTSPC son menos eficaces y los LTLSAR son más eficaces que los LTSPARo en cuanto a su capacidad de activar a los FSAR (Fig. 5B).

Gracias a los soportes permeables estudiamos el efecto exclusivo de los mediadores solubles en el sistema al no permitir el contacto directo entre las células. En los cocultivos realizados utilizando soportes permeables, el aumento de expresión del CD54 y de la IL-15 de superficie en los FSAR fue mínimo (Fig. 5B), lo cual indica que el contacto celular directo es necesario para que se inicie el diálogo entre los LT y FSAR, siendo los mediadores solubles liberados insuficientes para la activación de los FSAR.



**Figura 5. Análisis de la expresión de IL-15 y de CD54 de superficie en FSAR, determinada por citometría de flujo.** **A**, Diagramas de puntos representativos de los FSAR en reposo (izquierda) marcados con anti-IL15 (superior) o anti-CD54 (inferior); de los FSAR cocultivados con los LTSPARo durante 96 horas (central); y su anticuerpo monoclonal isotipo control (derecha). **B**, Expresión basal de CD54 e IL-15 de membrana en los FSAR (barras grises) y a las 96 horas de cocultivo con LTSPC, LTSPARo y LTLARS permitiendo el contacto celular de los FSAR con los LT (barras blancas) o usando soportes permeables (barras negras). Cada barra representa la media aritmética  $\pm$  D.E. de 20 sujetos por grupo \*  $p < 0,05$  vs FSAR en reposo; †  $p < 0,05$  vs FSAR cocultivados con LTSPC; ¥  $p < 0,05$  vs FSAR cocultivados con LTSPARo (test de U de Mann-Whitney).

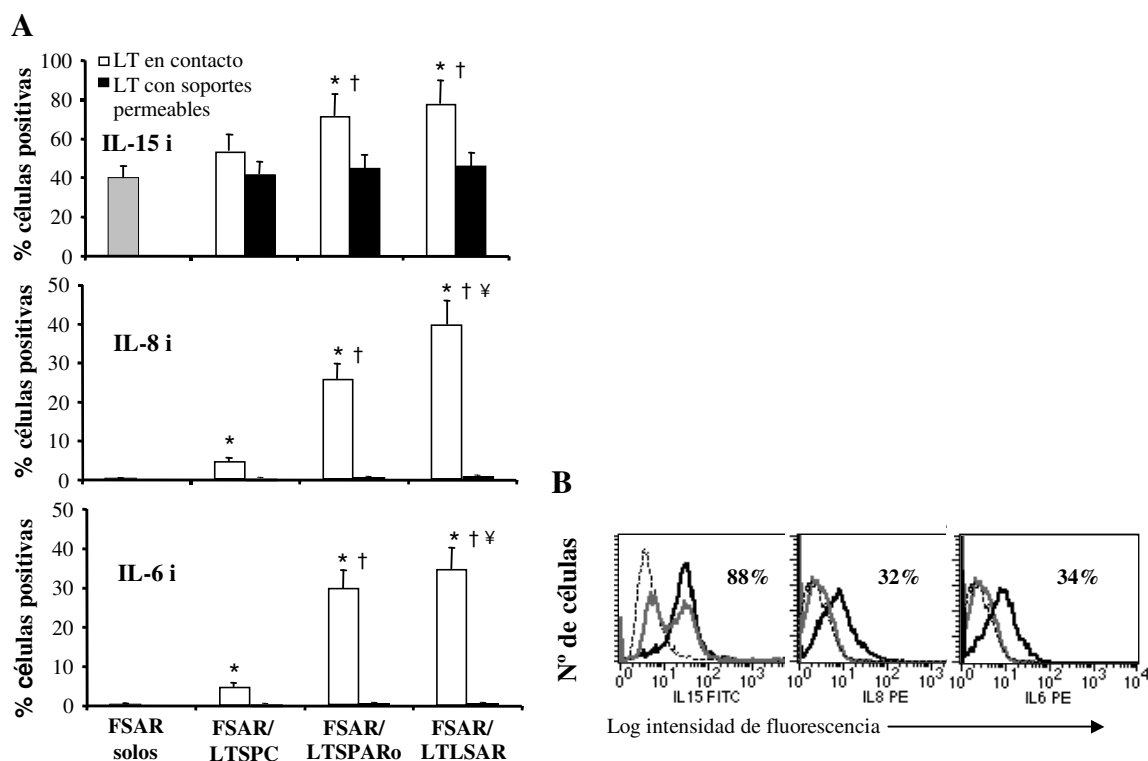
## 1.2 Efecto de los linfocitos T en la expresión (intracelular) de IL-15, IL-6 e IL-8 en los fibroblastos sinoviales.

### 1.2.1 Estudio por citometría de flujo.

Observamos que los FSAR expresaban constitutivamente de IL-15 intracelular, pero no IL-8, ni IL-6. A las 96 horas de iniciar el cocultivo con los LTSPARo, la expresión de IL-15 intracelular aumentó significativamente y se observó expresión de IL-6 e IL-8 (Fig. 6A).

En los cocultivos FSAR/LTSPC, la producción de IL-15, IL-6 e IL-8 intracelular por parte de los FSAR fue menor en comparación con el cocultivo de FSAR/LTSPARo. Sin embargo, los LTLARS indujeron un aumento significativo de la producción de estas citoquinas en los FSAR en comparación con los LTSPARo (Fig. 6A).

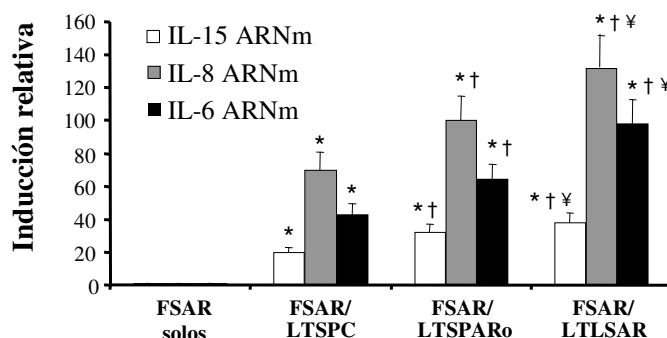
En los cocultivos de LT y FSAR separados por soportes permeables no se observó aumento en la expresión de estas citoquinas intracelulares en los FSAR (Fig. 6A). Esto indica de nuevo que el contacto celular directo es fundamental para iniciar el diálogo entre FSAR y LT, siendo menos importante la función de los mediadores solubles liberados por las células.



**Figura 6. Análisis de la expresión de IL-15, IL-8 e IL-6 intracelular en FSAR, determinada por citometría de flujo.** A, Expresión basal de IL-15, IL-8 e IL-6 intracelular (i) en los FSAR (barras grises) y a las 96 horas de cocultivo con LTSPC, LTSPARo y LTLsAR permitiendo el contacto celular de los FSAR con los LT (barras blancas) y usando soportes permeables (barras negras). Cada barra representa la media aritmética  $\pm$  D.E. de 20 sujetos por grupo. \*  $p < 0,05$  vs FSAR en reposo; †  $p < 0,05$  vs FSAR cocultivos con LTSPC; ¥  $p < 0,05$  vs FSAR cocultivos con LTSPARo (test de U de Mann-Whitney). B, Histogramas representativos de los FSAR a las 96 horas de cocultivarlos con LTSPARo, mostrando la expresión intracelular de IL-15, IL-8 e IL-6 basal (línea gris) y en el cocultivo (línea negra). La tinción con el isotipo control se representa con la línea punteada.

### 1.2.2 Estudio de la expresión de ARNm.

Por RT-PCR cuantitativa observamos en los FSAR un aumento de la expresión del ARNm de IL-15, IL-6 e IL-8 a las 48 horas después de iniciar el cocultivo con los LT (Fig. 7).



**Figura 7. Efecto del cocultivo con LT sobre la expresión del ARNm de IL-15, IL-8 e IL-6 en FSAR, determinado por RT-PCR cuantitativa.** Análisis realizado a las 48 horas de establecer el cocultivo de FSAR con LT. Datos mostrados como la inducción relativa en referencia a la expresión en los FSAR no cultivados con los LT. Los resultados de cada citoquina están normalizados para la expresión de  $\beta$ -actina medida en paralelo en cada muestra. Cada barra representa la media aritmética  $\pm$  D.E. de 20 sujetos por grupo. \*  $p < 0,05$  vs FSAR en reposo; †  $p < 0,05$  vs FSAR cocultivos con LTSPC; ¥  $p < 0,05$  vs FSAR cocultivos con LTSPARo (test de U de Mann-Whitney).

### 1.2.3 Estudio de la secreción de citoquinas solubles.

Determinamos la concentración de citoquinas solubles en los sobrenadantes de los cocultivos mediante kits de ELISA de forma paralela a la citometría de flujo. No logramos detectar secreción de IL-15 en los sobrenadantes de los cultivos de FSAR en reposo ni en los cocultivos con LT. Por el contrario, si detectamos IL-6 e IL-8 y siendo los niveles respectivamente:

	FSAR solos	FSAR cocultivados durante 96 horas con:		
		LTSPC	LTSPARo	LTLSAR
<b>IL-6</b>	indetectable	4,6±0,5	8,3±0,8	15,5±2,1
<b>IL-8</b>	indetectable	3,5±0,4	7,2±1,1	13,4±2,2

**Tabla 2.** Los datos mostrados en la tabla indican la media aritmética  $\pm$  D.E. en ng/ml de las distintas citoquinas en los sobrenadantes del cocultivo de FSAR y LT de 20 sujetos por grupo.

## 2. LOS FIBROBLASTOS SINOVIALES ACTIVAN A LOS LINFOCITOS T EN EL COCULTIVO, INDUCIENDO UN AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS Y MOLÉCULAS DE SUPERFICIE.

En el apartado anterior observamos que los FSAR expresan IL-15 en la superficie y que esta aumenta significativamente por el efecto de los LT en cocultivo. La IL-15 comparte muchas propiedades con la IL-2, que es un potente activador de LT. Por ello, decidimos estudiar el efecto de la IL-15 expresada por los FSAR sobre los LT en cocultivo, determinando la expresión de marcadores de activación y de citoquinas.

### 2.1 Efecto de los fibroblastos sinoviales sobre la expresión de CD69 y CD25 en la superficie los linfocitos T.

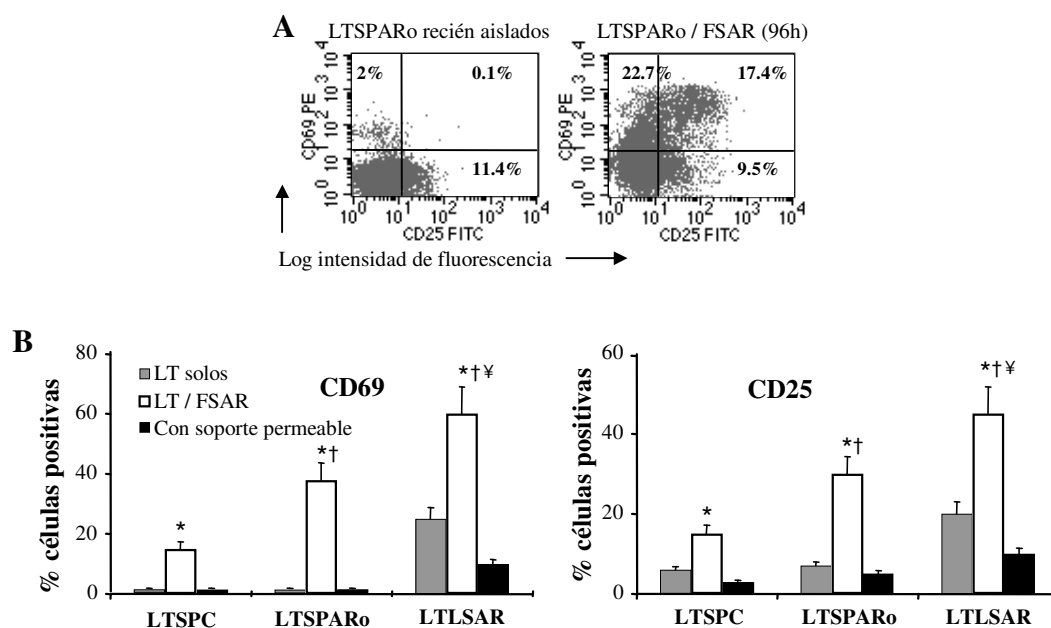
La expresión de CD69 en LTSPARo recién aislados fue casi indetectable y experimentó un notable aumento desde el inicio del cocultivo con FSAR. La expresión de CD25 en LTSPARo recién aislados fue escasa y aumentó más lentamente llegando al máximo a las 96 horas (Fig. 8A).

La expresión basal de ambas moléculas en los LTSPC fue similar a la de los LTSPARo y también aumentó en el cocultivo con FSAR, pero este incremento fue significativamente menor en comparación con los LTSPARo. La expresión basal de CD69 y de CD25 en los LTLSAR se encontró muy elevada y aumentó significativamente en el cocultivo con FSAR (Fig. 8B).

La expresión de ICAM-1 y LFA-1 en LT no se modificó en el cocultivo con FSAR. No se observó expresión basal de CD40L ni CTLA-4, y estas moléculas no se indujeron después de 120 horas de cocultivo (datos no mostrados).



En los cocultivos en los que se utilizan soportes permeables, el aumento de expresión en los LT del CD69 y del CD25 fue mínimo (Fig. 8B), indicando que el contacto celular directo es necesario para que se inicie el diálogo entre los LT y FSAR.



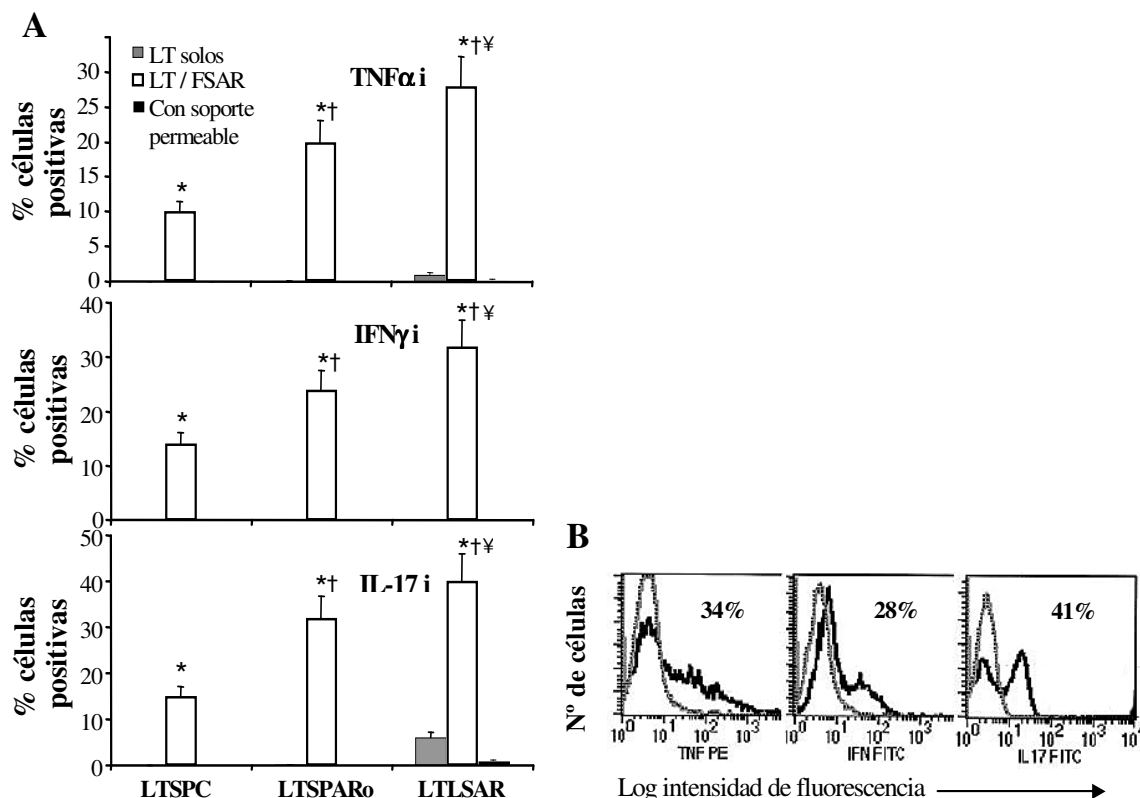
**Figura 8. Análisis comparativo de la expresión de CD69 y CD25 en los linfocitos T, determinado por citometría de flujo.** **A**, Diagramas de puntos representativos de la expresión de CD25 y CD69 en LTSPARo recién aislados (izquierda) y después de 96 horas de cocultivo con FSAR (derecha). **B**, Expresión de CD69 y CD25 en los LTSPC, LTSPARo o LTLSAR cultivados solos (barras grises), a las 96 horas del cocultivo con FSAR con contacto celular (barras blancas) y usando soportes permeables (barras negras). Cada barra representa la media aritmética  $\pm$  D.E. de 20 sujetos por grupo. \*  $p < 0,05$  vs los LT en reposo del mismo grupo de sujetos; †  $p < 0,05$  vs LTSPC en cocultivo; ¥  $p < 0,05$  vs LTSPARo en cocultivo (test de U de Mann-Whitney).

## 2.2 Efecto de los fibroblastos sinoviales sobre la expresión de las citoquinas IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ e IL-17 en los linfocitos T.

### 2.2.1 Estudio por citometría de flujo intracelular.

Analizamos la expresión de diferentes citoquinas intracelulares producidas por los LT mediante citometría de flujo. Los LTSPARo no sintetizaban constitutivamente ni IFN $\gamma$ , ni TNF $\alpha$ , ni IL-17 intracelular, pero en cocultivo con los FSAR observamos una expresión significativa a las 96 horas (Fig. 9A).

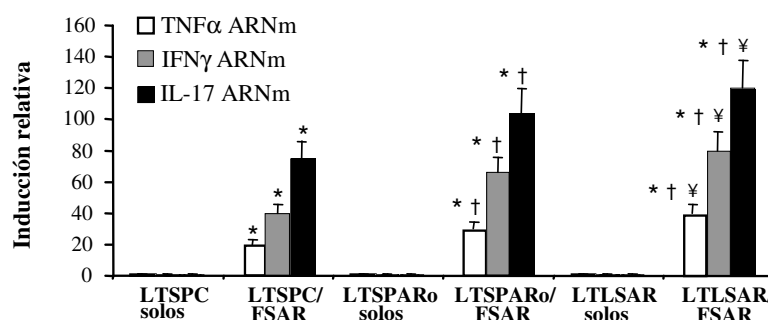
La expresión de estas citoquinas intracelulares observadas en los linfocitos T en cocultivo con FSAR fue significativamente mayor en los LTSPARo que en los LTSPC. Los LTLSAR expresan en cocultivo unos niveles superiores a los detectados en los LTSPARo (Fig. 9A). En los cocultivos en los que se utilizan soportes permeables, no aumenta la expresión intracelular de estas citoquinas en los LT (Fig. 9A). Estos datos nos sugieren que tanto el estado previo de activación de los linfocitos T como el contacto celular, facilita la comunicación entre los FSAR y los LT.



**Figura 9. Efecto del cocultivo con FSAR sobre la expresión de TNFα, IFNγ e IL-17 intracelular en linfocitos T, determinado por citometría de flujo.** A, Expresión de las citoquinas intracelulares en los LT recién aislados (barras grises), a las 96 horas de cocultivarlos con FSAR permitiendo el contacto celular (barras blancas) o bien usando soportes permeables (barras negras). Cada barra representa la media aritmética ± D.E. de 20 sujetos por grupo. \* p<0,05 vs la misma población de LT en reposo; † p<0,05 vs LTSPC en cocultivo; ‡ p<0,05 vs cocultivados con LTSPARo (test de U de Mann-Whitney). B, Histogramas representativos de citometría de flujo de los LTSPARo cocultivados con FSAR durante 96 horas. Se muestra la expresión intracelular de TNFα, IFNγ e IL-17 de los LT en reposo (línea gris) y en cocultivo (línea negra). La tinción con el isotipo control se muestra en línea punteada.

## 2.2.2 Estudio de la expresión de ARNm.

Mediante RT-PCR cuantitativa observamos una inducción de la expresión del ARNm de TNFα, IFNγ e IL-17 en los LT cocultivados con FSAR durante 48 horas (Fig. 10).



**Figura 10. Efecto del cocultivo con FSAR sobre la expresión de ARNm de TNFα, IFNγ e IL-17 en linfocitos T recién aislados, determinado por RT-PCR cuantitativa.** Análisis realizado a las 48 horas de establecer el cocultivo de LT con FSAR. Datos mostrados como la inducción relativa en referencia a la expresión de LT en reposo. Los resultados de cada citoquina están normalizados con la expresión de β-actina medida en paralelo en cada muestra. Cada barra representa la media aritmética ± D.E. de 20 sujetos por grupo. \* p<0,05 vs misma población de LT en reposo; † p<0,05 vs LTSPC en cocultivo; ‡ p<0,05 vs cocultivados con LTSPARo; (test de U de Mann-Whitney).

### 2.2.3 Estudio de la secreción de las citoquinas solubles.

Determinamos la concentración de las citoquinas solubles en los sobrenadantes de los cocultivos mediante kits de ELISA de forma paralela a la citometría de flujo. La secreción basal de TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-17 fue nula en los LTSPC, LTSPARo y LTLSAR. A las 96 horas del cocultivo con FSAR detectamos los siguientes niveles:

	Cocultivo de LT/FSAR a 96 horas:		
	LTSPC	LTSPARo	LTLSAR
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	240 $\pm$ 20	502 $\pm$ 53	1215 $\pm$ 152
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	180 $\pm$ 28	386 $\pm$ 45	875 $\pm$ 92
<b>IL-17</b>	120 $\pm$ 18	338 $\pm$ 42	932 $\pm$ 220

**Tabla 3.** Los datos mostrados en la tabla indican la media aritmética  $\pm$  D.E. en pg/ml de las distintas citoquinas en los sobrenadantes del cocultivo de FSAR y LT de 20 sujetos por grupo.

## 3. MOLÉCULAS DE MEMBRANA Y CITOQUINAS IMPLICADAS EN EL DIÁLOGO ENTRE LOS FIBROBLASTOS SINOVIALES Y LOS LINFOCITOS T. TRATAMIENTO CON ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES.

Con el propósito de evaluar la implicación de las moléculas de membrana y citoquinas en la activación observada en el cocultivo FSAR/LTSPARo, incubamos las células en presencia de distintos anticuerpos neutralizantes específicos y analizamos el grado de activación celular a las 96 horas. El porcentaje de inhibición se calculó:  $100 - [( \text{expresión de citoquina o marcador de membrana con anticuerpos neutralizantes} ) / ( \text{expresión de citoquina o marcador de membrana sin anticuerpos neutralizantes} )] \times 100$ .

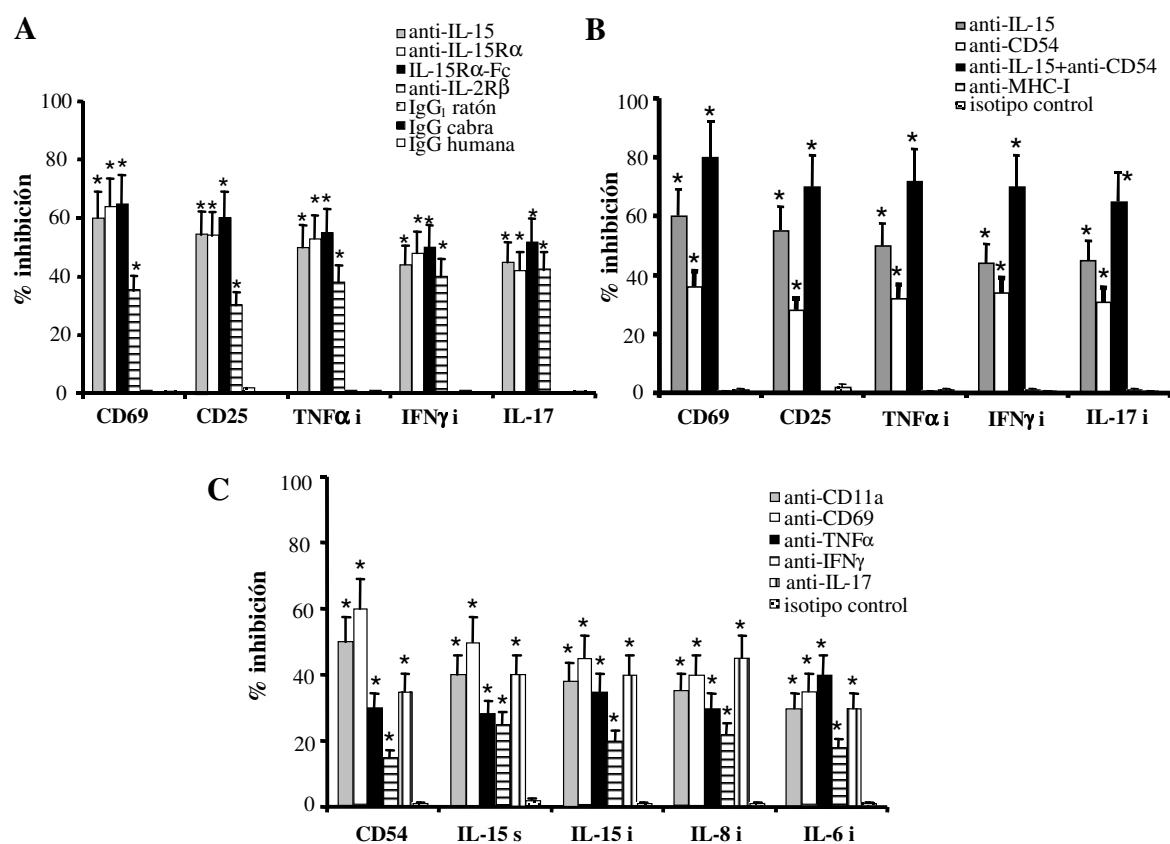
### 3.1 Tratamiento con inhibidores de IL-15, CD54 y su combinación para estudiar su implicación en la activación de LT en el cocultivo con FSAR.

Para estudiar la implicación de la IL-15 expresada por los FSAR en la activación de los LT, realizamos los cocultivos en presencia de distintos inhibidores de la IL-15. Observamos que la activación de los LTSPARo inducida por el cocultivo con los FSAR se inhibe de forma acentuada en presencia de los bloqueantes de la IL-15 (Fig. 11A). Estos datos sugieren que la IL-15 es fundamental en la activación contacto dependiente de los LT por parte de los FSAR.

Los experimentos anteriores sugieren que el contacto celular directo es fundamental para el inicio del diálogo entre LT/FSAR. Por ello, añadimos al cocultivo un AcMc frente a la molécula de adhesión CD54 (ICAM-1) y observamos una disminución moderada en la activación de los LTSPARo inducida por los FSAR en el cocultivo (Fig. 11B). La combinación de anticuerpos anti-CD54 y anti-IL15 fue sinérgica (Fig. 11B).

### 3.2 Tratamientos con inhibidores de moléculas de membrana y citoquinas producidas por los linfocitos T para estudiar la implicación de cada una de ellas en la activación de los FSAR.

En los experimentos anteriores observamos que el contacto celular es necesario para que los FSAR sean activados por los LTSPARo. Para confirmar la importancia de la adhesión de las moléculas CD54/LFA-1 en este sistema, añadimos un AcMc frente a LFA-1 (CD11a) y corroboramos esta hipótesis al observar una disminución significativa en el porcentaje de activación. Del mismo modo, los anticuerpos neutralizantes frente a CD69 y a las citoquinas producidas por los LT en el cocultivo, dieron lugar a una disminución significativa de la activación. Estos resultados nos indican que la expresión de estas moléculas sintetizadas por los LTSPARo contribuyen a la activación de los FSAR (Fig. 11C).



**Figura 11. Moléculas implicadas en el diálogo entre LTSPARo/FSAR. Efecto del tratamiento con anticuerpos neutralizantes, determinado por citometría de flujo.** El cocultivo de FSAR/LTSPARo se realizó en presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes específicos y a las 96 horas se analizaron las moléculas implicadas. Calculamos el porcentaje de inhibición con la fórmula:  $100 - [( \text{expresión de citoquina o marcador de membrana con anticuerpos neutralizantes} ) / ( \text{expresión de citoquina o marcador de membrana sin anticuerpos neutralizantes} )] \times 100$ . **A y B**, Porcentaje de inhibición de las distintas moléculas implicadas en la activación de LT en presencia de **(A)** anticuerpos neutralizantes frente a IL-15 (AcMc de ratón anti-IL-15, anticuerpo policlonal de cabra anti-IL-15Rα, constructo quimérico IL-15Rα-Fc y AcMc de ratón anti-IL-2Rβ) y **(B)** anticuerpos bloqueantes de ratón frente a IL-15 y/o CD54, y los controles correspondientes. **C**, Porcentaje de inhibición de las moléculas implicadas en la activación de FSAR en presencia de anticuerpos bloqueantes de ratón frente a CD69, LFA-1 (CD11a), TNFα, IFNγ o IL-17 y su isotipo control. Cada barra representa la media aritmética ± D.E. de 20 sujetos por grupo, excepto en los experimentos que usamos anti-IL-15Rα, IL-15Rα-Fc y anti-IL-2Rβ, en los cuales sólo 12 sujetos por grupo han sido testados. \* p<0,01 vs isotipo control o IgG normal. (s) superficie; (i) intracelular.

#### **4. LOS FIBROBLASTOS SINOVIALES DE ARTROSIS (FSA) EN REPOSO Y LOS FIBROBLASTOS DE PIEL (FP) NO EXPRESAN CONSTITUTIVAMENTE IL-15 DE MEMBRANA: LA CONDUCTA DE FSA Y FP EN EL COCULTIVO CON LT.**

Con el fin de averiguar si el comportamiento del cocultivo era específico de los FSAR, estudiamos la interacción de los LT con fibroblastos de distintas localizaciones: fibroblastos de membrana sinovial de pacientes con artrosis (FSA) y fibroblastos de piel (FP).

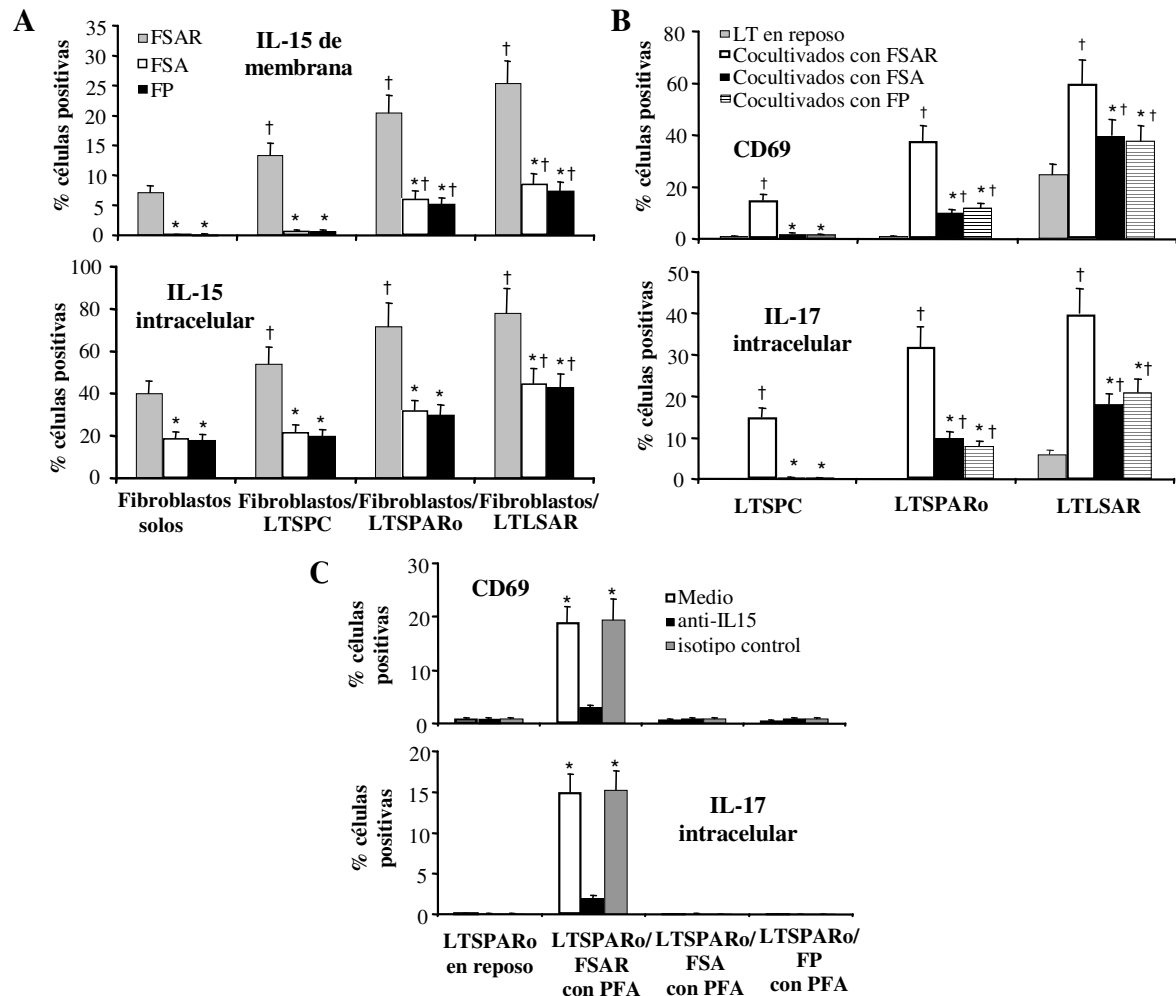
##### **4.1 Estudio comparativo de la activación del cocultivo entre los diferentes tipos de fibroblastos.**

En primer lugar determinamos si ambos tipos de fibroblastos expresan IL-15. Ni en FSA ni en FP conseguimos detectar IL-15 de membrana constitutiva, pero si observamos en ambos IL-15 intracelular, aunque su expresión fue inferior a la mostrada por los FSAR (Fig. 12A).

Al cocultivar FSA o FP con LTSPC se observó una mínima activación bidireccional (Fig. 12, A y B), indicándonos que los FSA y los FP no poseen la capacidad de inducir el fenotipo de activación en los LTSPC y estos a su vez, tampoco en ellos. En los cocultivos de LTSPARo con FSA o FP sí se observó activación bidireccional, aunque en niveles significativamente inferiores a los observados en cocultivos de LTSPARo/FSAR. Esto nos indica que los LTSPARo son capaces de inducir un pequeño estado de activación en los FSA y los FP, los cuales a su vez estimulan a los LTSPARo estableciendo un circuito proinflamatorio. En los cocultivos de LTLSAR con FSA o FP se observó una activación bidireccional significativa, aunque inferior a la observada con los cocultivos de FSAR/LTLSAR (Fig. 12, A y B). Esto nos sugiere que el grado de activación de los LTLSAR es suficiente para estimular a los FSA y a los FP e iniciar el proceso inflamatorio.

##### **4.2 Efecto de la IL-15 de membrana de los fibroblastos fijados con paraformaldehído (PFA) sobre los linfocitos T.**

La fijación celular con PFA se realiza para mantener la integridad de la membrana evitando la producción y liberación de citoquinas, de forma que el efecto observado es exclusivo de las proteínas que median el contacto celular (Lacraz, Isler et al. 1994). Los fibroblastos fijados con PFA no secretan citoquinas ni siquiera al realizar la fijación después de estimularlos con IL-1 $\beta$  (1 ng/ml). Fijamos los fibroblastos con PFA y evaluamos el comportamiento de los FSAR en comparación con los FSA y FP, en el cocultivo con LTSPARo. En la figura 12C, observamos que sólo los FSAR fijados con PFA fueron capaces de inducir la expresión de CD69 e IL-17 en los LTSPARo cocultivados, aunque no alcanzó el nivel expresado con los FSAR vivos. Este efecto se anuló con un AcMc neutralizante anti-IL-15 pero no con su AcMc isotipo control.

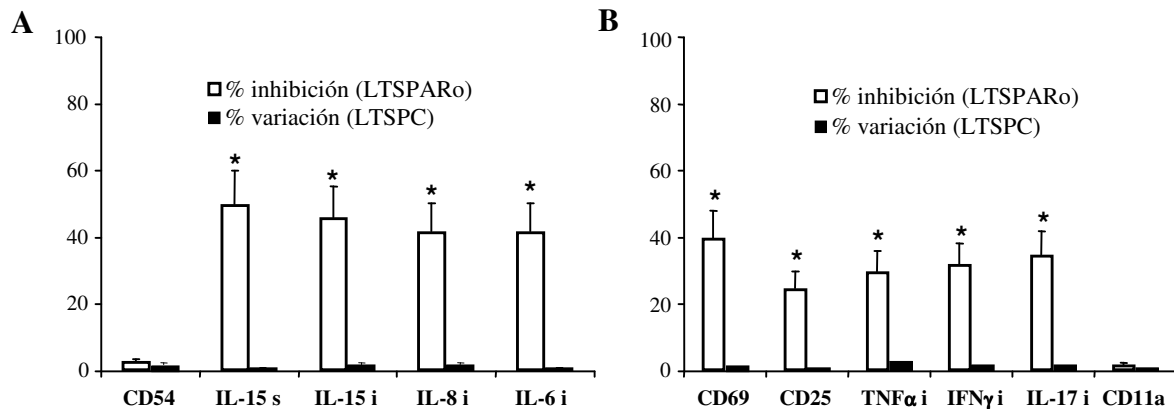


**Figura 12.** Análisis comparativo del comportamiento de los fibroblastos sinoviales de artritis reumatoide (FSAR), los fibroblastos sinoviales de artrosis (FSA) y los fibroblastos de piel (FP) a las 96 horas del cocultivo con linfocitos T, determinado por citometría de flujo. **A**, Expresión de IL-15 de membrana e intracelular en FSAR, FSA y FP en reposo y a las 96 horas del cocultivo con LTSPC, LTSPARo o LTLSAR. \*  $p < 0,005$  vs FSAR; †  $p < 0,05$  vs fibroblastos en reposo del mismo origen tisular. Cada barra representa la media aritmética  $\pm$  D.E. de 20 sujetos por grupo (cocultivados con FSAR) o 10 sujetos por grupo (cocultivados con FSA y FP). **B**, Expresión de CD69 e IL-17 intracelular de los LTSPC, LTSPARo y LTLSAR, en condiciones de reposo y a las 96 horas del cocultivo con FSAR, FSA y FP. \*  $p < 0,05$  vs LT cocultivados con FSAR; †  $p < 0,005$  vs LT en reposo del mismo origen tisular. Cada barra representa la media aritmética  $\pm$  D.E. de 20 sujetos por grupo (cocultivo con FSAR) o 10 sujetos por grupo (cocultivo con FSA y FP). **C**, Análisis de la expresión de CD69 y de IL-17 intracelular en LTSPARo en cocultivo con FSAR, FSA y FP fijados con PFA. Las células fueron cocultivadas con medio solo, con AcMc ratón neutralizante anti-IL-15 o su AcMc isotipo control. \*  $p < 0,01$  vs LTSPARo en reposo. Cada barra representa la media aritmética  $\pm$  D.E. de 10 sujetos por grupo.

## 5. EFECTO DEL CONTROL DE LA ENFERMEDAD EN LAS INTERACCIONES ENTRE FSAR / LT *ex vivo*.

Seguidamente nos planteamos si las señales de activación entre los FSAR y los linfocitos T disminuían en los pacientes con remisión completa. Para ello, 5 de los pacientes con ARo donaron sangre por segunda vez cuando enfermedad había remitido. Realizamos los mismos

experimentos de cocultivo y los comparamos con los resultados obtenidos al inicio del tratamiento. La activación bidireccional de los cocultivos de FSAR/LTSPAR decreció significativamente en comparación con la respuesta al inicio del tratamiento (Fig. 13). Este resultado indica que el estado de activación basal que poseen los linfocitos T al inicio de la enfermedad disminuye y se regula *in vivo* por los FAMEs una vez que la actividad de la enfermedad ha remitido.



**Figura 13. Inhibición de la activación de los linfocitos T de sangre periférica de pacientes con AR de inicio (LTSPARo) al alcanzar la remisión completa de la enfermedad, determinado por citometría de flujo.** Cinco de los pacientes con AR de inicio donaron sangre por segunda vez en el momento en que habían alcanzado remisión completa. También se obtuvo sangre de los 5 sujetos sanos que previamente sirvieron de control para esos pacientes y se establecieron los cocultivos con el mismo cultivo primario de FSAR utilizado en el experimento anterior al tratamiento. La expresión de citoquinas, moléculas de adhesión y marcadores de activación en LT y en FSAR se determinó a las 96 horas del cocultivo. Los resultados se compararon para cada paciente con los obtenidos antes de iniciar el tratamiento. El porcentaje de inhibición se calculó de esta forma:  $100 - [(expresión \text{ de marcadores de superficie o citoquinas al inicio del experimento}) / (expresión \text{ de marcadores de superficie o citoquina en el momento en el paciente ha alcanzado la remisión completa})] \times 100$ . Cada barra representa la media aritmética  $\pm$  D.E. de cinco sujetos. \*  $p < 0,01$  vs expresión antes de iniciar el tratamiento. (s) superficie (i) intracelular.

## A2. IMPLICACIÓN DE LAS INTERACCIONES ENTRE LOS LINFOCITOS T Y MONOCITOS EN LA PATOGENIA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE: OSTEOCLASTOGÉNESIS.

En el siguiente bloque nos propusimos analizar si los LT de pacientes con AR tienen capacidad de inducir diferenciación osteoclástica en monocitos autólogos. Para ello, establecimos cocultivos con las células separadas magnéticamente.

### 1. EXPRESIÓN DE IL-15 Y RANKL EN LOS LINFOCITOS T Y MONOCITOS DE PACIENTES CON AR.

#### 1.1 Expresión de IL-15 y RANKL en los linfocitos T de pacientes con AR.

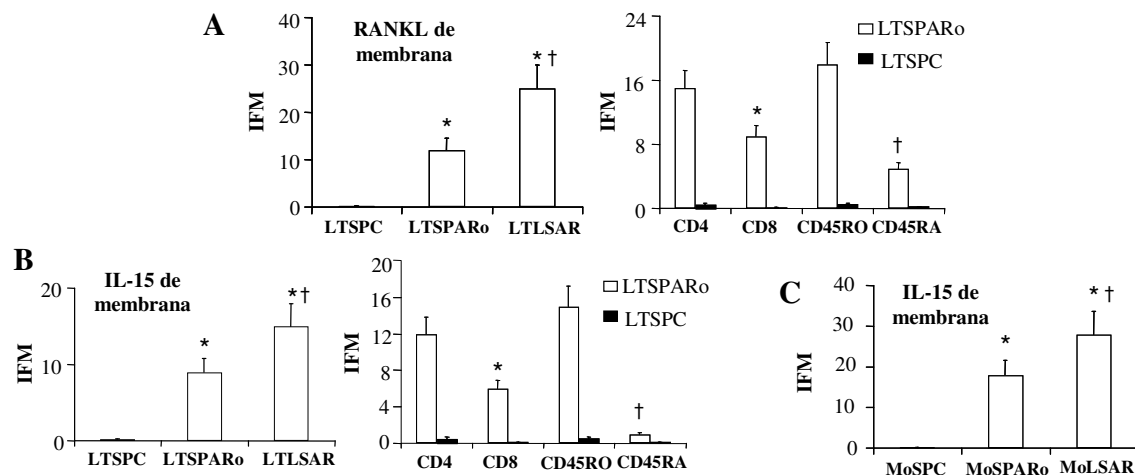
Como primer paso estudiamos la expresión de membrana del factor osteoclastogénico RANKL y del factor de crecimiento IL-15 en LTSPARo y LTLSAR. Tanto los LTSPARo como

los LTLSAR recién aislados muestran signos de activación. Observamos expresión de RANKL e IL-15 en la membrana de ambos grupos. Esta expresión fue superior en las subpoblaciones CD4+ y CD45RO+ en comparación con los CD8+ y CD45RA+ respectivamente. Sin embargo, apenas se detectó RANKL e IL-15 en la membrana de LTSPC (Fig. 14A y B).

En los LTSPARo se observó un aumento de la expresión del marcador de activación HLA-DR en comparación con los LTSPC (datos no mostrados).

## 1.2 Expresión de IL-15 en los monocitos de pacientes con AR.

Por otro lado, los monocitos de sangre periférica de pacientes con AR de inicio (MoSPARo) y los monocitos de líquido sinovial de pacientes con AR establecida (MoLSAR) pueden favorecer el posible proceso osteoclastogénico, puesto que se ha descrito que en la AR, los monocitos muestran signos de activación (Stuhlmuller, Ungethum et al. 2000). Por ello, examinamos la expresión de IL-15 en la membrana. Detectamos expresión de la misma en los monocitos recién aislados de ambos grupos, pero no en los monocitos de sangre periférica de sujetos sanos (MoSPC) (Fig. 14C).



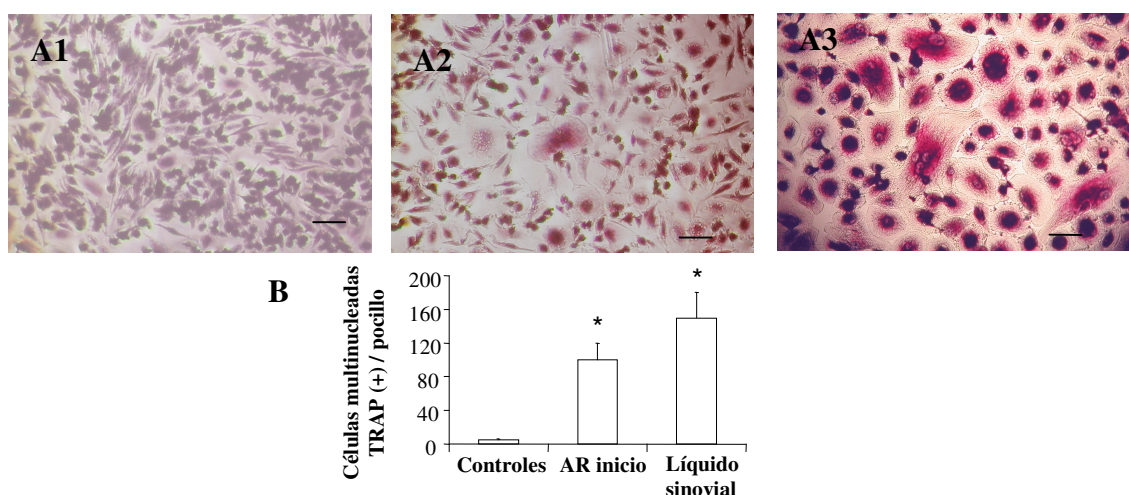
**Figura 14. Expresión de RANKL e IL-15 en la membrana celular, determinado por citometría de flujo.** **A y B,** Análisis de la expresión de RANKL e IL-15 de membrana respectivamente, en LTSPC, LTSPARo y LTLSAR. **C,** Análisis de la expresión de IL-15 de membrana en MoSPC, MoSPARo y MoLSAR. En las figuras A–C, mostramos a la izquierda un diagrama de barras que representa la media aritmética  $\pm$  D.E. de la intensidad de fluorescencia media (IFM) de **A,** RANKL en LT, **B,** IL-15 en LT, y **C,** IL-15 en Mo para cada grupo de sujetos. Cada barra representa la media aritmética  $\pm$  D.E. de 20 sujetos por grupo. \*  $p < 0,05$  vs expresión en las células de controles sanos; †  $p < 0,05$  vs expresión en las células de pacientes con AR de inicio. A la derecha se hayan unos gráficos de barras que representan la media aritmética  $\pm$  D.E. de la expresión de RANKL e IL-15 de membrana, respectivamente, en las subpoblaciones de LT (CD4+, CD8+, CD45RO+ y CD45RA+) de la sangre periférica de 20 pacientes con AR de inicio y los controles sanos. \*  $p < 0,05$  vs expresión en LT CD4+; †  $p < 0,05$  vs expresión en LT CD45RO+.



## 2. DIFERENCIACIÓN OSTEOCLASTOGENICA EN COCULTIVOS DE LINFOCITOS T / MONOCITOS AUTÓLOGOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON AR DE INICIO Y DE LÍQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON AR ESTABLECIDA.

### 2.1 Formación de osteoclastos.

El osteoclasto se caracteriza fenotípicamente como una célula multinucleada y positiva para la tinción con fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP). Estudiamos la formación de osteoclastos en los cocultivos de LT/Mo autólogos de SPARo y de LSAR, establecidos en ausencia de RANKL o factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSF) exógeno. Realizamos la tinción de TRAP a los 14 días del cocultivo. En ellos, identificamos elevado número de células multinucleadas TRAP+, sin embargo, en cocultivos de LT/Mo procedente de sangre periférica de sujetos sanos, apenas se observan osteoclastos (Fig. 15).



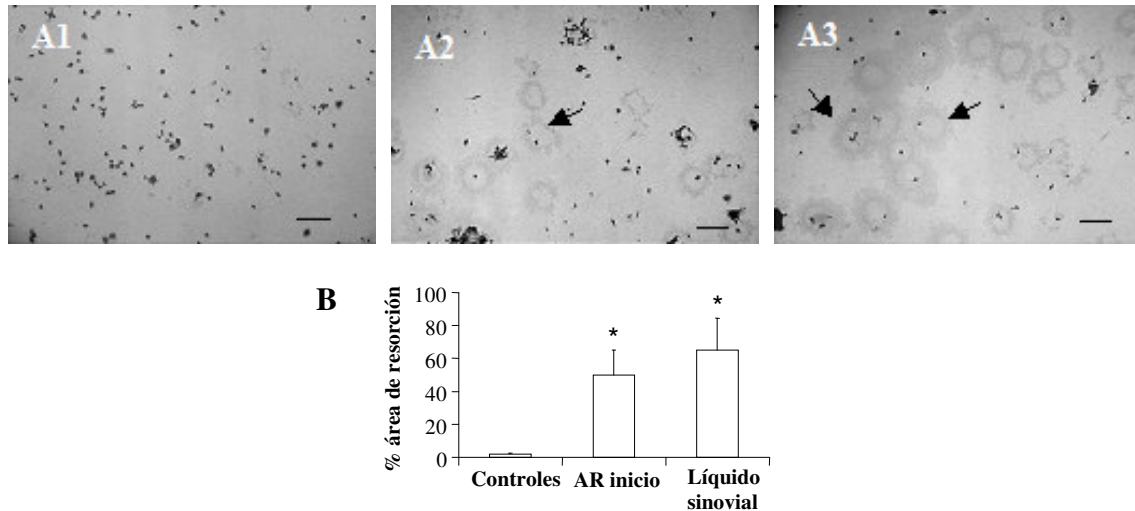
**Figura 15. Efecto del cocultivo de linfocitos T con monocitos autólogos de pacientes con AR: diferenciación osteoclastogénica.** **A**, Los cocultivos de LT/Mo autólogos de **A1**, sangre periférica de controles sanos, **A2**, sangre periférica de pacientes con AR de inicio, o **A3**, líquido sinovial de pacientes con AR, se establecieron en placas de 24 pocillos sin añadir M-CSF o RANKL exógenos. A los 14 días, eliminamos las células no adherentes y teñimos las células adherentes con TRAP. Denominamos osteoclasto a la célula TRAP+ que posee 3 o más núcleos (Barra = 20  $\mu$ m). **B**, Diagrama de barras del número de células multinucleadas TRAP+ para cada grupo a los 14 días iniciado el cocultivo. Cada barra representa la media aritmética  $\pm$  D.E. de 20 sujetos por grupo. \*  $p < 0,05$  vs controles sanos. Aplicamos la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones.

### 2.2 Capacidad resortiva.

Para evaluar si los osteoclastos eran funcionalmente activos, estudiamos su capacidad resortiva de hueso. Realizamos los cocultivos de LT/Mo en una superficie cubierta de una matriz de hidroxiapatita similar al hueso. El porcentaje de área resorbida en los cocultivos derivados de SPC fue mínimo. Sin embargo, se encontró resorción significativa en los cocultivos derivados de SPARo, siendo el área resorbida superior en los cocultivos derivados de LSAR (Fig. 16). Este dato confirma que los osteoclastos formados son funcionales. A los 14 días del cocultivo, los LT

segúan siendo viables, lo cual se demostró con la tinción con anexina V y 7-aminoactinomicina D (datos no mostrados).

Con estos datos afirmamos que los LTSPARo, sin estímulo exógeno, inducen diferenciación a osteoclastos con monocitos autólogos.

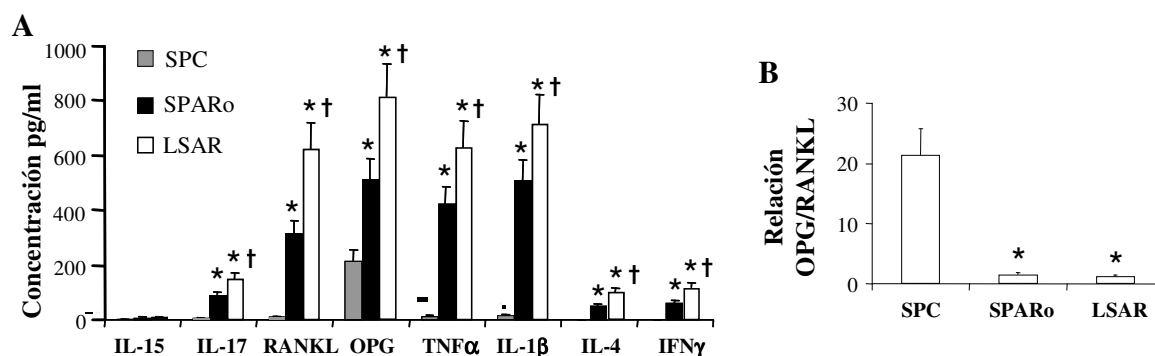


**Figura 16. Ensayo de resorción de hueso como evidencia funcional de la diferenciación a osteoclasto en el cocultivo de linfocitos T y monocitos autólogos de pacientes con AR.** A, Los cocultivos de LT/Mo autólogos de A1, sangre periférica de controles sanos, A2, sangre periférica de pacientes con AR de inicio, o A3, líquido sinovial de pacientes con AR, se mantuvieron durante 14 días en unos portaobjetos cubiertos de una matriz de hidroxiapatita. A continuación, eliminamos las células adherentes con 5% de hipoclorito sódico. Los portaobjetos se lavaron con agua destilada y se secaron al aire. Las flechas muestran las áreas de erosión. También se observan vestigios celulares que se mantuvieron adheridos al portaobjetos a pesar de los continuos lavados. Barras = 20  $\mu$ m. B, Diagrama de barras del porcentaje del área resorbida calculada para cada grupo. Cada barra representa la media aritmética  $\pm$  D.E. de 20 sujetos por grupo. \*  $p < 0,05$  vs controles sanos. Aplicamos la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones.

### 2.3 Secreción de mediadores solubles.

Estudiamos por ELISA la concentración de diversas citoquinas en los sobrenadantes de los cocultivos. Se observó que la concentración de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17, RANKL, OPG, IL-4 e IFN $\gamma$  fue significativamente superior en los cocultivos derivados de SPARo que en los cocultivos derivados de SPC y fue máxima en los cocultivos derivados de LSAR (Fig. 17A). Sin embargo la relación OPG:RANKL fue menor en los cocultivos de SP y LS de ARo en comparación con los cocultivos de SPC (Fig. 17B). Como hemos observado en apartados anteriores, no fuimos capaces de detectar IL-15 soluble en los sobrenadantes.

En los cocultivos donde utilizamos soportes permeables para separar a los LT de los monocitos no observamos osteoclastogénesis significativa (datos no mostrados). Lo cual sugiere que el contacto celular es necesario para iniciar el diálogo entre los LT y los monocitos, de forma que los mediadores solubles liberados en el cocultivo que no permite contacto celular directo, son insuficientes para inducir osteoclastogénesis.

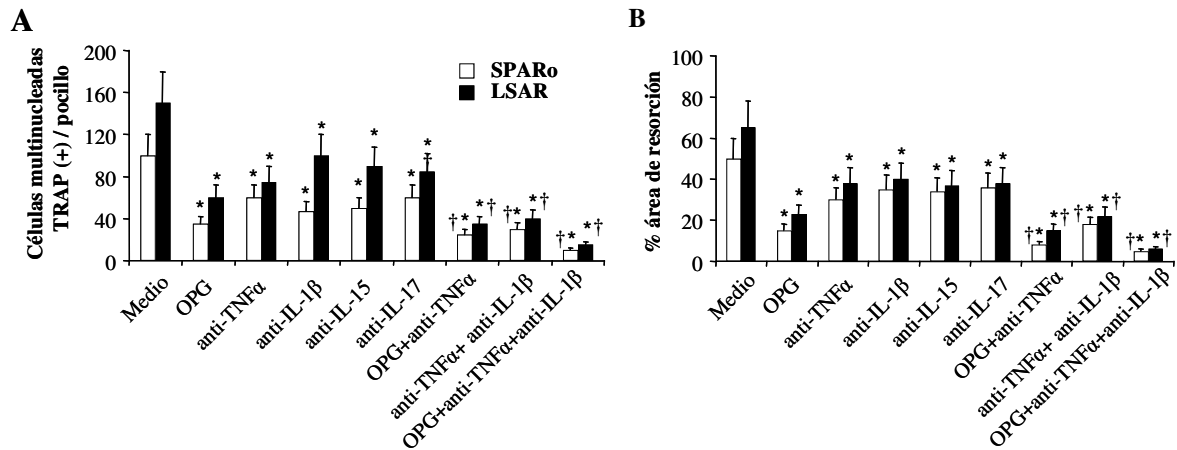


**Figura 17. Concentración de las citoquinas solubles en sobrenadantes de cocultivos linfocitos T/monocitos autólogos sin estímulo exógeno, determinado por ELISA. A,** Diagrama de barras que representa la concentración de IL-15, IL-17, RANKL, OPG, TNFα, IL-1β, IL-4 e IFNγ soluble en los sobrenadantes de cocultivo de LT/Mo autólogos derivados de SPC, SPARo y LSAR. La concentración de IL-15 soluble fue < 10 pg/ml en todos los cocultivos. Cada barra representa la media aritmética ± D.E. de 20 sujetos por grupo. \* p<0,05 vs SPC; † p<0,05 vs SPARo. **B,** Diagrama de barras de la relación OPG:RANKL en sobrenadantes de cocultivos LT/Mo autólogos derivados de SPC, SPARo y LSAR. Cada barra representa la media aritmética ± D.E. de 20 sujetos por grupo. \* p<0,05 vs SP de controles sanos.

### 3. EFECTO DE LA OPG Y DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES EN LA OSTEOCLASTOGENESIS PRODUCIDA EN LOS COCULTIVOS DE LINFOCITOS T / MONOCITOS.

Los resultados que obtuvimos en los experimentos anteriores indicaron que en los cocultivos derivados de pacientes con AR se produce una secreción aumentada de IL-17, OPG, TNFα e IL-1β. Este hecho se acompañó de un incremento en la osteoclastogénesis. Por tanto, nos propusimos evaluar la función de estas citoquinas sobre la osteoclastogénesis mediante la utilización de anticuerpos neutralizantes.

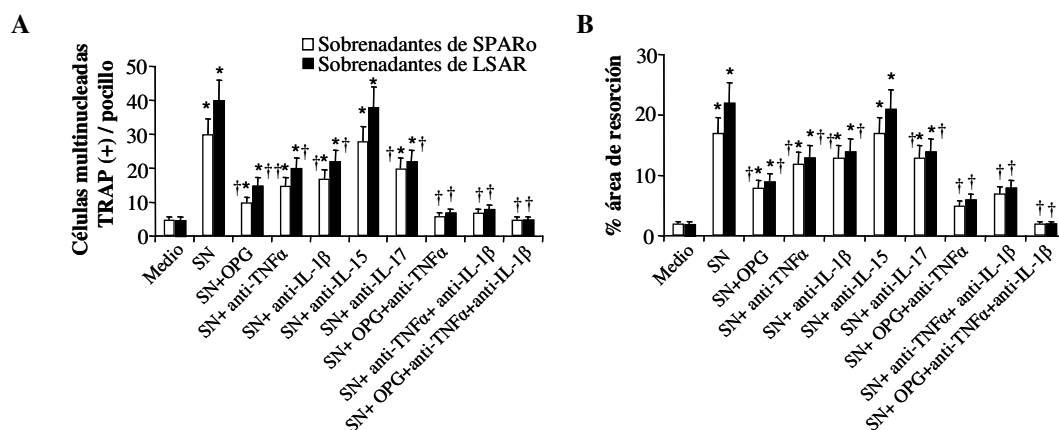
En nuestro sistema *in vitro*, la osteoclastogénesis se inhibió significativamente en presencia de OPG-Fc, indicando que el RANKL es fundamental en este proceso. También observamos disminución al añadir anticuerpos neutralizantes frente a TNFα, IL-β, IL-15 e IL-17. Puesto que existe evidencia de que el TNFα coopera con concentraciones mínimas de RANKL (D, Ireland et al. 2004), decidimos probar el efecto de la combinación de un AcMc neutralizante anti-TNFα con OPG-Fc; ello dio lugar a una mayor supresión de la osteoclastogénesis. De igual forma observamos un efecto sinérgico en la combinación de anti-TNFα con anti-IL-1β (Fig. 18). Los controles isotípicos correspondientes y el control de unión inespecífica a superficie (“binding control”; W6/32: un monoclonal anti-HLA clase I) no produjeron ningún efecto (Fig. 18).



**Figura 18. Efecto de la osteoprotegerina (OPG) y anticuerpos neutralizantes en la osteoclastogénesis observada en cocultivos linfocitos T / monocitos *in vitro*.** Diagrama de barras del número de células multinucleadas TRAP+ (A) y el porcentaje de área resorbida (B) determinado en los cocultivos de LT/Mo derivados de SPARo y de LSAR en presencia o ausencia de OPG, anti-TNFα, anti-IL-1β, anti-IL-15 o anti-IL-17 (10 µg/ml). Cada barra representa la media aritmética ± D.E. de 20 sujetos por grupo. \* p<0,05 vs células cultivadas en medio; † p<0,05 para células cultivadas con una combinación de anticuerpos neutralizantes vs células cultivadas en la presencia de sólo uno de los anticuerpos. El efecto del anticuerpo isotipo control fue insignificante (dato no incluido en el gráfico de barras).

#### 4. EFECTO DE LAS CITOQUINAS SOLUBLES LIBERADAS EN LOS COCULTIVOS LINFOCITOS T / MONOCITOS EN LA OSTEOCLASTOGÉNESIS *ex vivo*.

Recogimos, sin mezclarlos, los sobrenadantes de 5 cocultivos de LT/Mo de SPARo. A continuación, cocultivamos LT/Mo de sangre periférica de 5 sujetos sanos con el sobrenadante del cocultivo de los pacientes (diluido 1:1 con medio de cultivo fresco). Transcurridos 14 días observamos que se había producido diferenciación osteoclastogénica (Fig. 19). De igual forma, añadimos 5 sobrenadantes de los cocultivos de LT/Mo de LSAR a los cocultivos de LT/Mo SPC e indujeron resultados similares (diluido 1:1 con medio de cultivo fresco) (Fig. 19). Tanto el OPG-Fc, como los anticuerpos neutralizantes frente a TNFα, IL-1β o IL-17 disminuyeron la formación de osteoclastos inducida por el sobrenadante. Sin embargo, un anticuerpo frente a IL-15 no tuvo ningún efecto (Fig. 19). Estos experimentos indican que los cocultivos derivados de SPARo y de LSAR secretan una cantidad de citoquinas biológicamente activas significativamente superior a los cocultivos de SPC, y es consistente con la ausencia de IL-15 soluble en los sobrenadantes.



**Figura 19. Efecto de la osteoprotegerina (OPG) y anticuerpos neutralizantes en la osteoclastogénesis inducida por los sobrenadantes de los cocultivos de linfocitos T / monocitos de AR.** Diagrama de barras del número de células multinucleadas TRAP+ por pocillo (**A**) y el porcentaje de área resorbida (**B**) determinado en los cocultivos de LT/Mo derivados de SP de sujetos sanos mantenidos durante 14 días con el 50% del sobrenadante del cocultivo de LT/Mo de SPARo o de LSAR y el 50% de medio normal. También se les añadió OPG, anti-TNF $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-15 o anti-IL-17. Las barras representan la media aritmética  $\pm$  D.E. de 5 sujetos por grupo. \*  $p < 0,05$  vs células cultivadas sólo en medio; †  $p < 0,05$  vs células cultivadas con el sobrenadante. El efecto de anticuerpos isotipos controles fue insignificante (dato no incluido en el gráfico de barras).

## 5. EFECTO DEL CONTROL DE LA ENFERMEDAD SOBRE LA OSTEOCLASTO-GÉNESIS OBSERVADA *ex vivo*.

Un año después del diagnóstico de la AR, realizamos los mismos experimentos expuestos en los apartados anteriores. Dieciséis de los pacientes con AR de inicio donaron sangre por segunda vez, al igual que sus controles. Todos los pacientes estaban recibiendo MTX oral y 6 de ellos tomaban además prednisona oral. Ocho de ellos se encontraban en remisión completa (DAS28  $< 2,6$  (Balsa, Carmona et al. 2004)); los 8 restantes habían experimentado mejoría clínica significativa, con una disminución en el DAS28  $\geq 2,0$  puntos, pero todavía tenían enfermedad activa (DAS28  $> 2,6$ ).

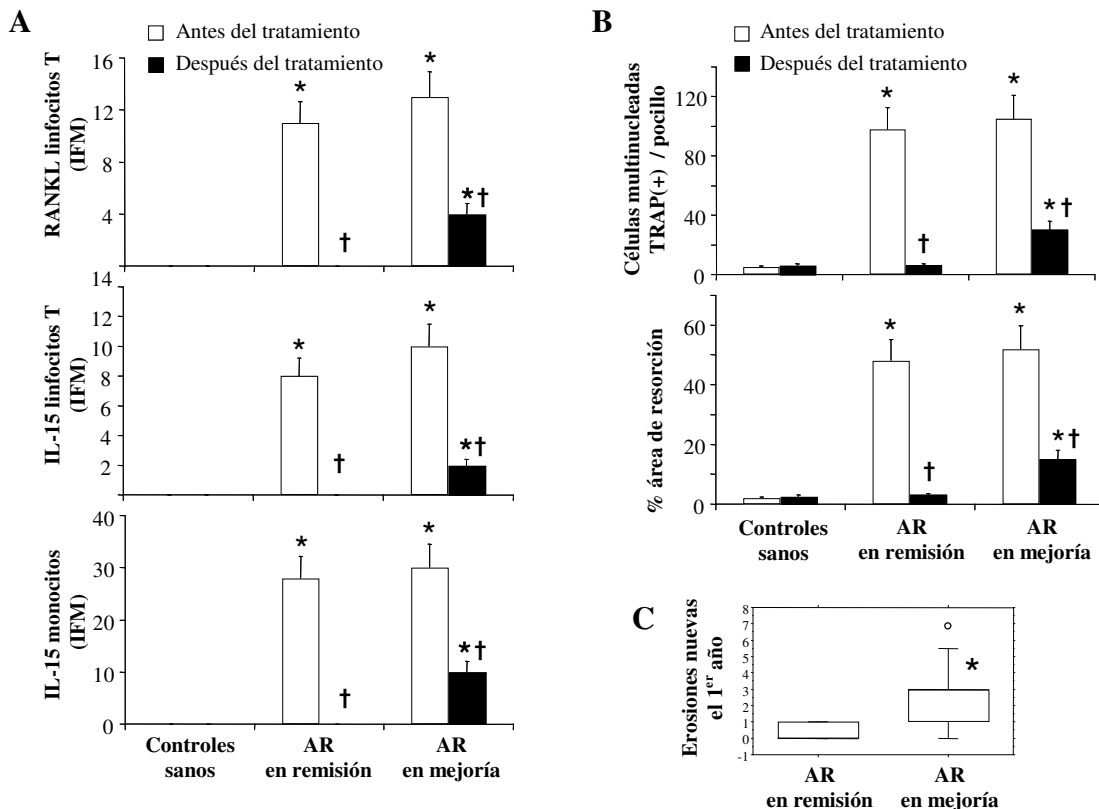
En el grupo de pacientes con AR que se encontraban en remisión completa, ya no se observó expresión de RANKL en la superficie de los LT, ni expresión de IL-15 en la superficie de LT ni de monocitos (Fig. 20A). Al mismo tiempo, la diferenciación *ex vivo* de monocitos hacia osteoclastos se redujo significativamente y no fue distinta de la encontrada en los cocultivos de controles sanos (Fig. 20B). En el grupo de pacientes que no alcanzaron remisión completa, estos cambios fueron menos marcados (Fig. 20 A y B). Estos resultados indican que el estado de activación basal mostrado por los LT y los monocitos de pacientes con AR de inicio es modulado negativamente *in vivo* a medida que se controla la actividad de la enfermedad.

La expresión basal de RANKL e IL-15 analizada en la primera visita, no fue significativamente diferente entre el grupo de pacientes que alcanzó remisión completa y el grupo

de los que mejoraron significativamente pero cuya enfermedad permaneció activa (Fig. 20A). La variación experimental observada en los controles sanos fue mínima.

Por otro lado, el número de nuevas erosiones en las radiografías de manos y pies realizadas al año de seguimiento, fue significativamente menor en los pacientes que alcanzaron remisión completa en comparación con los pacientes que experimentaron mejoría clínica (Fig. 20C).

Analizamos con particular interés si la expresión basal de RANKL y/o IL-15 de superficie, o bien el grado de osteoclastogénesis *ex vivo* son capaces de predecir de manera independiente la aparición de erosiones óseas en pacientes con AR de inicio. Después de realizar ajustes estadísticos teniendo en cuenta la actividad basal de la enfermedad y la persistencia de la actividad de la enfermedad, no se observó correlación entre el número de erosiones nuevas al cabo de un año de seguimiento y la expresión basal en superficie de RANKL, la expresión basal en superficie de IL15 o el grado de osteoclastogénesis.



**Figura 20. Expresión de RANKL e IL-15 de membrana y la osteoclastogénesis *ex vivo* en pacientes con AR después de un año de tratamiento.** Dieciséis de los pacientes con AR de inicio donaron sangre por segunda vez al año de iniciar el tratamiento con metotrexato oral (MTX); a 6 de ellos se les administró adicionalmente prednisona oral a dosis de 2.5–5 mg/día. Se analizó por separado a los pacientes que han logrado remisión completa de los que sólo han demostrado una respuesta parcial al tratamiento. **A**, Expresión RANKL e IL-15 de membrana en LT y de IL-15 en monocitos antes y después de iniciar el tratamiento. **B**, Evaluación de la formación de osteoclastos en los cocultivos de LT y monocitos autólogos. El resultado de cada paciente se comparó con los resultados obtenidos antes de iniciar el tratamiento. Cada barra representa media aritmética  $\pm$  D.E. de 8 sujetos por grupo. \*  $p < 0,05$  vs controles sanos; †  $p < 0,05$  vs el mismo grupo de pacientes en la primera visita, antes de iniciar el tratamiento. **C**, Gráfico de caja que indica el número de nuevas erosiones en manos y pies al año de seguimiento de los pacientes con AR de inicio. Las líneas horizontales representan los límites superior e inferior del rango intercuartil. Los bigotes representan el máximo y el mínimo valor. \*  $p < 0,05$  vs pacientes con la enfermedad en remisión.

## **B. DESCRIPCIÓN DE NUEVAS MOLÉCULAS EXPRESADAS POR FIBROBLASTOS DEL LÍQUIDO SINOVIAL DE ARTRITIS REUMATOIDE Y LINFOCITOS T HUMANOS.**

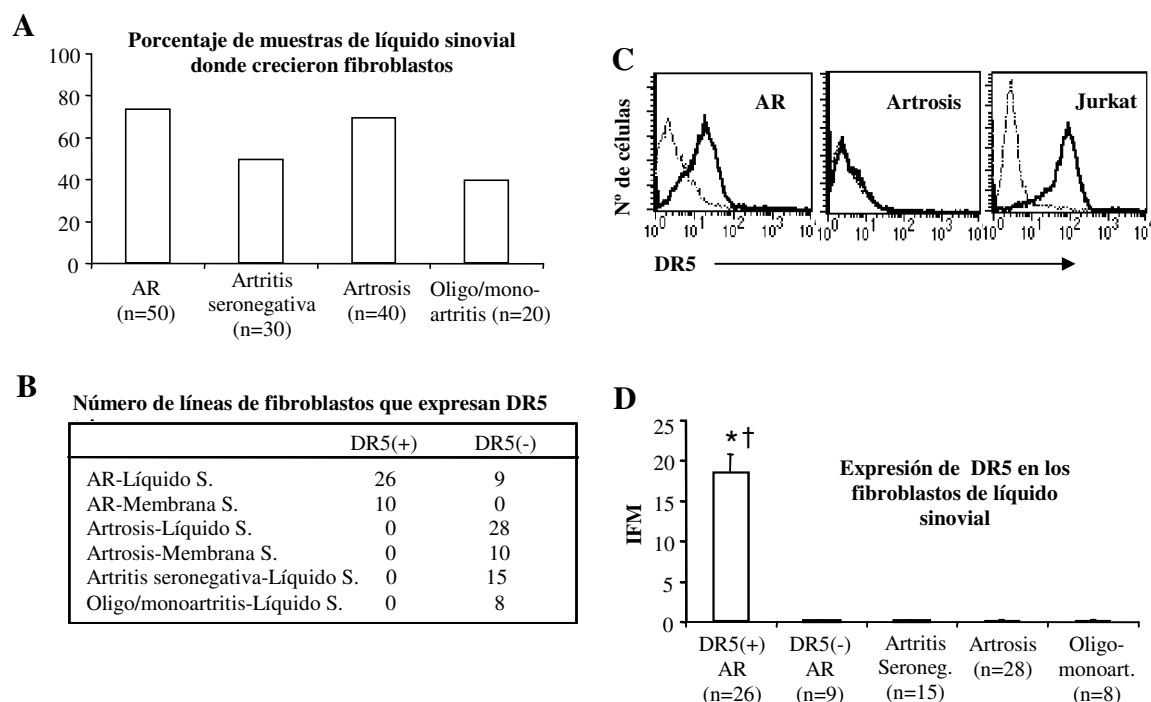
### **B1. LOS FIBROBLASTOS DE LÍQUIDO SINOVIAL DE ARTRITIS REUMATOIDE EXPRESAN TRAILR2 (DR5) QUE ES FUNCIONALMENTE ACTIVO.**

En este apartado, investigamos la procedencia de los fibroblastos aislados del líquido sinovial de pacientes con AR (FLSAR) utilizando un anticuerpo monoclonal anti-DR5. Los tejidos normales no expresan DR5 a nivel de proteína, mientras que los tumores malignos expresan niveles elevados de DR5. Se ha descrito que los fibroblastos sinoviales de AR (FSAR) comparten la expresión de DR5 con células transformadas. Por lo tanto, los FLSAR que expresan DR5 podrían proceder de la membrana sinovial.

#### **1. EXPRESIÓN DE DR5 EN FIBROBLASTOS DE LÍQUIDO SINOVIAL.**

Aislamos y cultivamos células mononucleares del líquido sinovial de pacientes con AR, artropatía seronegativa, artrosis y monoartritis u oligoartritis no clasificadas. Observamos crecimiento progresivo de células fusiformes en algunos de estos cultivos (Fig. 21A). En el tercer pase, el 100% de estas células eran fibroblastos (Thy-1+, CD45-, CD68-).

Observamos crecimiento de fibroblastos en 35 de las muestras de líquido sinovial de pacientes con AR, 26 de ellas fueron DR5+ y 9 fueron DR5- (Fig. 21B). En las demás patologías, todos los fibroblastos de los líquidos sinoviales fueron DR5- (Fig. 21D). Como control positivo se utilizó la línea celular de leucemia de LT, Jurkat, que expresa niveles elevados de DR5 (Fig. 21C). Los fibroblastos sinoviales procedentes de tejido sinovial de AR obtenido de muestras quirúrgicas (artroplastía o sinovectomía) fueron DR5+. Sin embargo, las líneas de fibroblastos obtenidos de tejido sinovial de pacientes con artrosis, así como los fibroblastos de piel, fueron DR5- (Fig. 21B).



**Figura 21. Expresión de DR5 en fibroblastos cultivados a partir de líquido sinovial de pacientes con AR.** **A**, Diagrama de barras del porcentaje de crecimiento de fibroblastos en las muestras de líquido sinovial. **B**, Número de cultivos primarios de fibroblastos procedentes de líquido o membrana sinovial (S.) de distintas patologías que expresan o no DR5. **C**, Histogramas de fluorescencia representativos de la expresión de DR5 de superficie (línea continua) y su isotipo control (línea discontinua) en los fibroblastos de líquido sinovial de pacientes con AR, con artrosis o de la línea celular Jurkat. **D**, Diagrama de barra de la IFM de DR5 en fibroblastos de líquido sinovial, determinado por citometría de flujo. La barra representa media aritmética  $\pm$  D.E. \*  $p < 0,001$  vs fondo del marcaje, mediante el test de los signos de Wilcoxon. †  $p < 0,001$  vs DR5- de fibroblastos de líquido sinovial de pacientes con AR, mediante el test de U de Mann-Whitney.

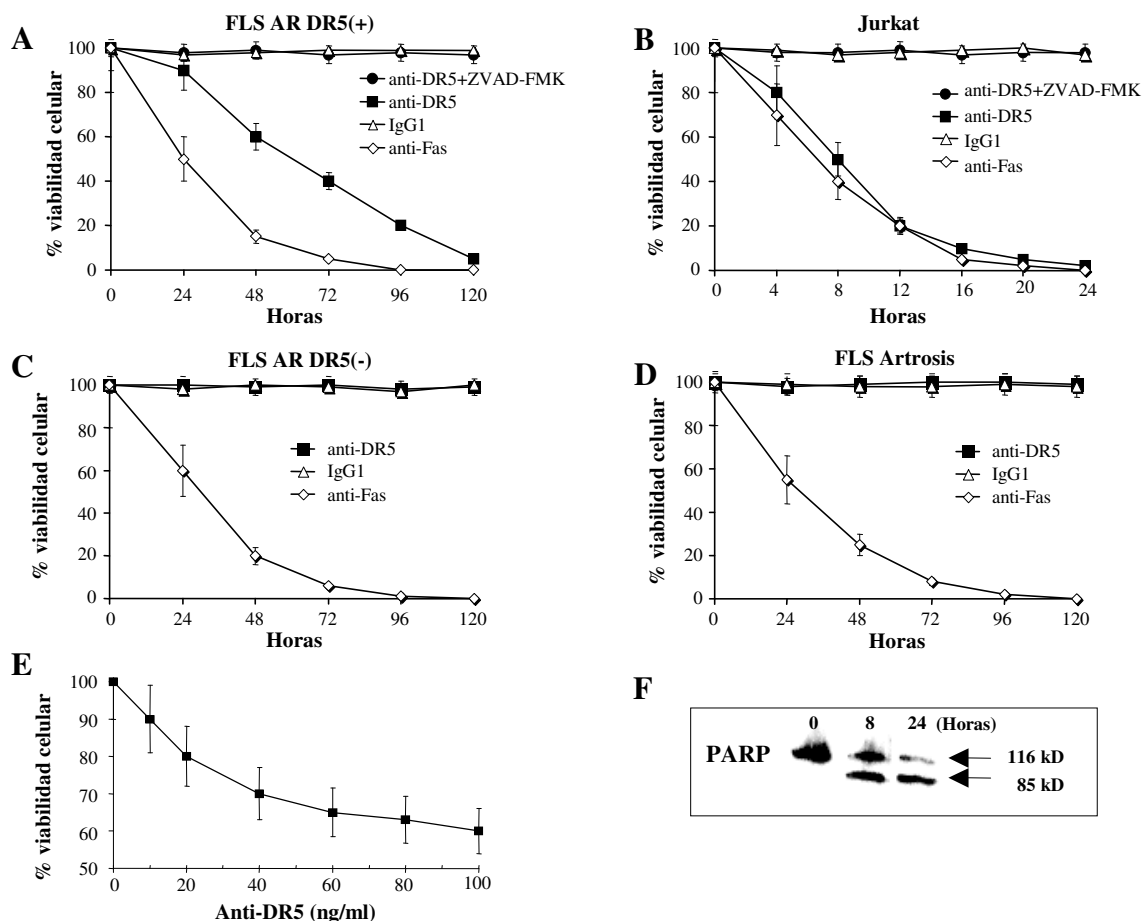
## 2. EL DR5 EXPRESADO EN LA MEMBRANA DE LOS FLSAR ES FUNCIONALMENTE ACTIVO: EFECTO DE UN ANTICUERPO AGONISTA ANTI-DR5 EN LOS FLSAR DR5+ Y DR5-.

El tratamiento in vitro con un AcMc anti-DR5 indujo apoptosis en los FLSAR DR5+. Ello se demostró con ensayos Alamar Blue, Western Blot y tinción de yoduro de propidio (IP) y anexina V.

Además con los ensayos de Alamar Blue determinamos que este efecto se bloqueó en presencia de un inhibidor general de caspasas (ZVAD-FMK) (Fig. 22A y B). Las líneas de fibroblastos DR5- no sufrieron apoptosis al ser tratadas con anti-DR5 (Fig. 22C y D). Como control positivo utilizamos un AcMc anti-Fas y comprobamos que indujo apoptosis en ambas líneas de fibroblastos DR5+ y DR5- (Figuras 22A-D).

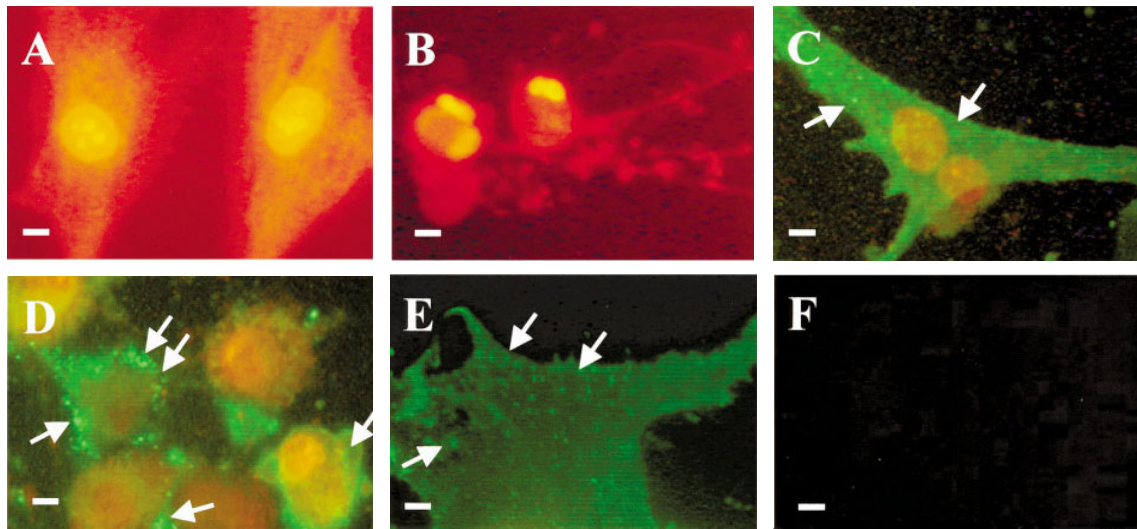
Mediante un inmunoblot de extractos celulares demostramos que la polimerasa poli(ADP-ribosa) (PARP) se fragmenta, dato característico de la apoptosis, en los fibroblastos de líquido sinovial DR5+ tratados con anti-DR5 (Figura 22F).





**Figura 22. Efecto del tratamiento con un anticuerpo agonista anti-DR5 sobre los fibroblastos de líquido sinovial DR5+ o DR5-.** A–D, Curso temporal de la inducción de apoptosis (rango de 0 a 120 horas). Incubamos las células con un AcMc anti-DR5 (100 ng/ml) en presencia o ausencia de un inhibidor general de caspasas (Z-VAD-FMK 20 nM). Como controles incubamos las células un AcMc anti-Fas o un AcMc isotipo control. La viabilidad celular se cuantificó con Alamar Blue. Las barras muestran la media  $\pm$  SEM del porcentaje de células viables comparadas con el 100% de las células viables en el cultivo sin tratamiento ( $n = 10$  pacientes por grupo). E, Curva dosis-respuesta del AcMc anti-DR5 a las 48 horas de incubación con los FLSAR DR5+. F, La incubación de los fibroblastos de líquido sinovial DR5+ con un AcMc agonista anti-DR5 da como resultado la fragmentación de la polimerasa poli(ADP-ribosa) (PARP). Inmunoblot de un lisado celular que demuestra la presencia de PARP completa (116 kd) en fibroblastos no apoptóticos. A las 8 y 24 horas de la adición de un AcMc anti-DR5 observamos un fragmento de 85-kd, característico de la apoptosis.

También se confirmó la inducción de apoptosis en los FLSAR DR5+ con el AcMc anti-DR5 mediante tinción con anexina V y yoduro de propidio (Fig. 23). Estos resultados sugieren que los fibroblastos obtenidos del líquido sinovial de pacientes con AR son al menos de dos estirpes distintas: aquellos que expresan DR5 comparten esta característica con células transformadas y con los fibroblastos derivados de tejido sinovial, y probablemente derivan de la membrana sinovial. El origen de los fibroblastos DR5- no está claro. Puesto que todos los pacientes con AR cuyo líquido sinovial dio origen a fibroblastos DR5- tenían enfermedad activa, no creemos que esos fibroblastos DR5- procedan de una membrana sinovial “quemada”.



**Figura 23. Imágenes de fluorescencia de cultivos de fibroblastos DR5+ procedentes de líquido sinovial de pacientes con AR (FLSAR).** **A**, Tinción típica con yoduro de propidio (IP) de fibroblastos no apoptóticos. Los FLSAR control se cultivaron, se permeabilizaron con metanol y se tiñeron con IP, mostrando el núcleo con un naranja brillante y le rodea el citoplasma rojo. **B**, Los FLSAR se trataron con un AcMc anti-DR5 durante 72 horas y se tiñeron con IP mostrando una disminución acentuada del tamaño celular con condensación y fragmentación del núcleo, características de apoptosis. En este estado, el IP se introduce en las células sin necesidad de permeabilizarlas. **C**, Marcaje de la membrana con anexina V de células apoptóticas tratadas con un AcMc anti-DR5 durante 12 horas. El tamaño del citoplasma está ligeramente reducido. Señalizamos con las flechas evidentes protuberancias emergentes de la membrana celular. Debido a que en este estado la membrana celular está intacta, las células después de marcarlas con anexina V se lavaron, se permeabilizaron con saponina y se contratiñeron con IP para visualizar el núcleo. **D**, Marcaje de anexina V y IP de FLSAR no permeabilizados, incubados con un AcMc anti-DR5 durante 48 horas. Se muestra una disminución marcada del tamaño del citoplasma y con protuberancias, con el núcleo condensado. En este estado, el IP se introduce espontáneamente debido a que la membrana está permeabilizada. **E**, La membrana de la célula con un estadio de apoptosis temprano muestra claramente la tinción con anexina V. Con las flechas marcamos las pequeñas protuberancias emergentes. Debido a que la célula no ha sido permeabilizada, el IP no es capaz de introducirse a través de la membrana intacta y, por tanto, el núcleo no es visible. **F**, No se observó marcaje de anexina V en la membrana de células no apoptóticas y el IP no se introduce en la membrana celular intacta. Barra = 10  $\mu$ m. Cada panel es representativo de 6 experimentos independientes con 6 líneas diferentes de fibroblastos DR5+ de líquido sinovial de AR.

## **B2. LOS LINFOCITOS T HUMANOS EXPRESAN CONSTITUTIVAMENTE IL-15, QUE INDUCE PROLIFERACIÓN *ex vivo* POR MECANISMOS AUTOCRINOS/YUXTACRINOS.**

### **1. LOS LINFOCITOS T HUMANOS SE DIVIDEN EN CULTIVO EN AUSENCIA DE ESTÍMULOS EXÓGENOS, Y LA VELOCIDAD DE LA DIVISIÓN ESTÁ EN FUNCIÓN DE LA DENSIDAD CELULAR.**

El análisis por citometría de flujo de los linfocitos T humanos marcados con CFSE demostró que se dividen *ex vivo* en ausencia de factores de crecimiento exógenos, y que la velocidad de división depende de la densidad celular. Establecimos el cultivo en placas de 24 pocillos durante 12 días y observamos que el porcentaje de LT divididos fue mínimo cuando la

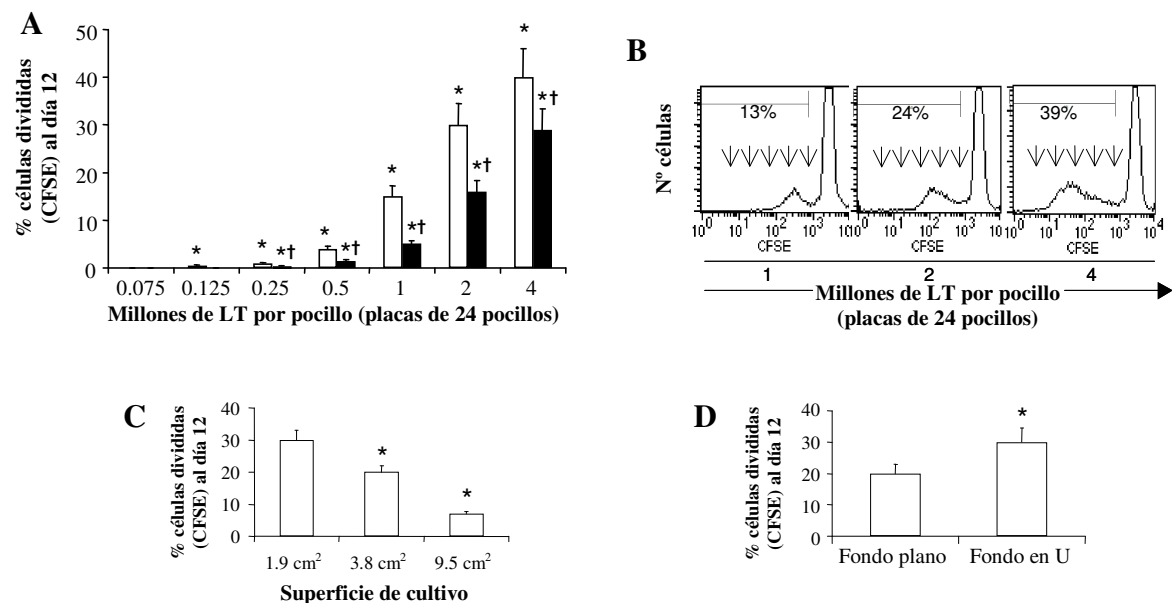
densidad celular fue menor de  $1 \times 10^6$ , mientras que a medida que se aumenta la densidad celular la velocidad de división aumenta de forma proporcional (Fig. 24A y B).

Para determinar si las divisiones son dependientes de factores solubles o del contacto celular, realizamos tres experimentos diferentes:

- Utilización de soportes permeables: El porcentaje de divisiones celulares en cada compartimiento (superior o inferior respectivamente) fue similar con respecto a cultivos donde el número total de células por pocillo era el mismo que el presente en cada compartimiento. (Fig. 24A)

- Variación del área de cultivo: Los LT se cultivaron en el mismo volumen de medio pero en diferentes superficies: placa de 24 pocillos ( $1,9 \text{ cm}^2/\text{pocillo}$ ), de 12 pocillos ( $3,8 \text{ cm}^2/\text{pocillo}$ ) o de 6 pocillos ( $9,5 \text{ cm}^2/\text{pocillo}$ ). El porcentaje de proliferación de los LT es menor en un área de cultivo mayor (Fig. 24C).

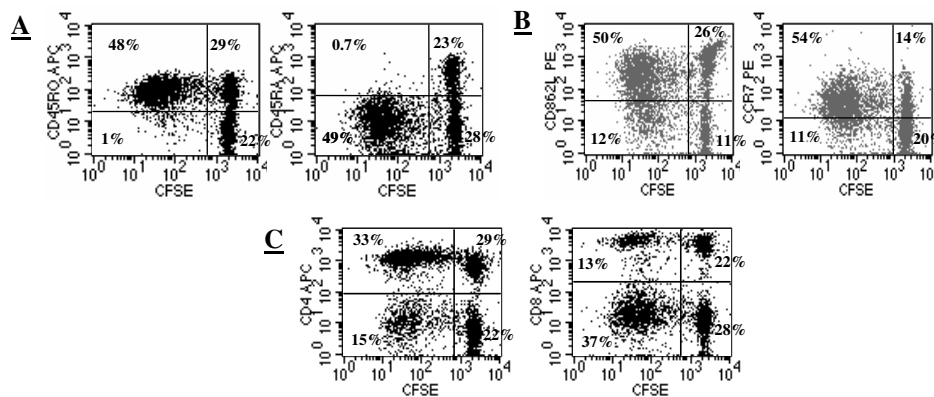
- Fondo en U vs fondo plano: El porcentaje de proliferación de los LT fue mayor en las placas de fondo en U al favorecer el contacto celular (Fig. 24D).



**Figura 24. División de los LT humanos *ex vivo*. Porcentaje de células divididas, determinado por citometría de flujo con marcaje con CFSE.** **A**, El diagrama de barras muestra el porcentaje de divisiones de los LT marcados con CFSE cultivados durante 12 días en placas de 24 pocillos a diferentes densidades celulares, sin (barras blancas) o con (barras negras) soporte permeable que separa el 50% de los LT en el compartimiento superior del otro 50% de los LT en el compartimiento inferior. Cada barra representa la media aritmética  $\pm$  D.E. de 20 sujetos por grupo. \*  $p < 0,01$  vs LT cultivados a la densidad inmediatamente inferior, †  $p < 0,01$  vs LT cultivados a la misma densidad, sin soporte permeable. **B**, Histogramas representativos de la división de los linfocitos T marcados con CFSE y cultivados durante 12 días a diferentes concentraciones sin soporte permeable. **C**, Porcentaje de los LT divididos cultivados a  $2 \times 10^6/\text{pocillo}$  durante 12 días en 2ml de medio en diferentes áreas [24 pocillos ( $1,9 \text{ cm}^2$ ), 12 pocillos ( $3,8 \text{ cm}^2$ ) ó 6 pocillos ( $9,5 \text{ cm}^2$ )]. Cada barra representa la media aritmética  $\pm$  D.E. de 20 sujetos por grupo. \*  $p < 0,01$  vs LT cultivados al área inmediatamente inferior. **D**, Porcentaje de LT divididos cultivados a  $2 \times 10^5/\text{pocillo}$  durante 12 días en 200 $\mu$ l de medio, en placas de 96 pocillos en fondo plano o fondo en U. Cada barra representa la media aritmética  $\pm$  D.E. de 20 sujetos por grupo. \*  $p < 0,01$  vs LT cultivados en pocillos de fondo plano.

Estos experimentos sugieren que la división homeostática de los linfocitos T observada *ex vivo* es iniciada por factores que actúan a través de contacto celular y no por contaminantes exógenos presentes en el medio de cultivo. Por otro lado, los niveles de factores de crecimiento fisiológicos para LT, IL-2, IL-7 e IL-15 determinados por ELISA, fueron inferiores a 10 pg/ml en sobrenadantes de 12 días de cultivo (datos no mostrados).

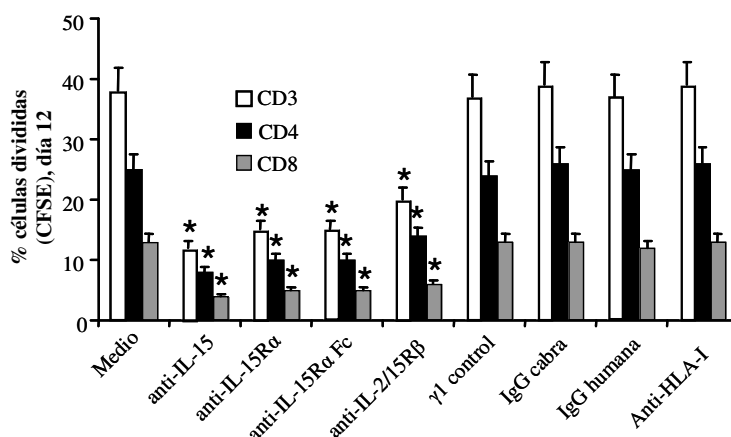
Analizando por citometría de flujo las subpoblaciones de células marcadas con CFSE, observamos que las células divididas eran LT de memoria (LT<sub>M</sub>) al tener fenotipo CD45RO (Fig. 25A) y estas expresan los marcadores de LT<sub>M</sub> central (CCR7 y CD62L) (Sallusto, Lenig et al. 1999) (Fig. 25B). Comprobamos que tanto los linfocitos T CD4 como los CD8 proliferaban (Fig. 25C). El mayor porcentaje de LT CD4 en división refleja la mayor proporción de LT CD4 en sangre periférica, junto con un mayor porcentaje de fenotipo CD45RO en linfocitos T CD4 (Akbar, Borthwick et al. 1993).



**Figura 25. Análisis de la proliferación de las subpoblaciones de LT, determinado por citometría de flujo.** Los LT marcados con CFSE fueron cultivados durante 12 días en placas de 24 pocillos a  $4 \times 10^6$  células/pocillo. Mostramos diagramas de puntos representativo de 20 experimentos. **A**, CD45RO y CD45RA en células CD3+. **B**, CD62L y CCR7 en células CD45RO+CD3+. **C**, CD4 y CD8 en células CD3+.

## 2. EFECTO DE LOS ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES ANTI-IL15 SOBRE LA DIVISIÓN HOMEOSTÁTICA *ex vivo* DE LOS LINFOCITOS T.

A pesar de no encontrar IL-15 soluble en los sobrenadantes de cultivo, al añadir distintos anticuerpos neutralizantes observamos una inhibición significativa de la división de los LT marcados con CFSE (Fig. 26), mientras que los anticuerpos controles correspondientes no mostraron efecto alguno. Analizando las subpoblaciones por citometría de flujo se confirmó que la inhibición ocurre tanto en LT CD4 como en CD8 (Fig. 26). Estos datos sugieren que la IL-15 que poseen los LT induce proliferación a través de un circuito autocrino/paracrino. Por tanto, a continuación pasamos a examinar la expresión de la IL-15 e IL-15R $\alpha$  en linfocitos T.

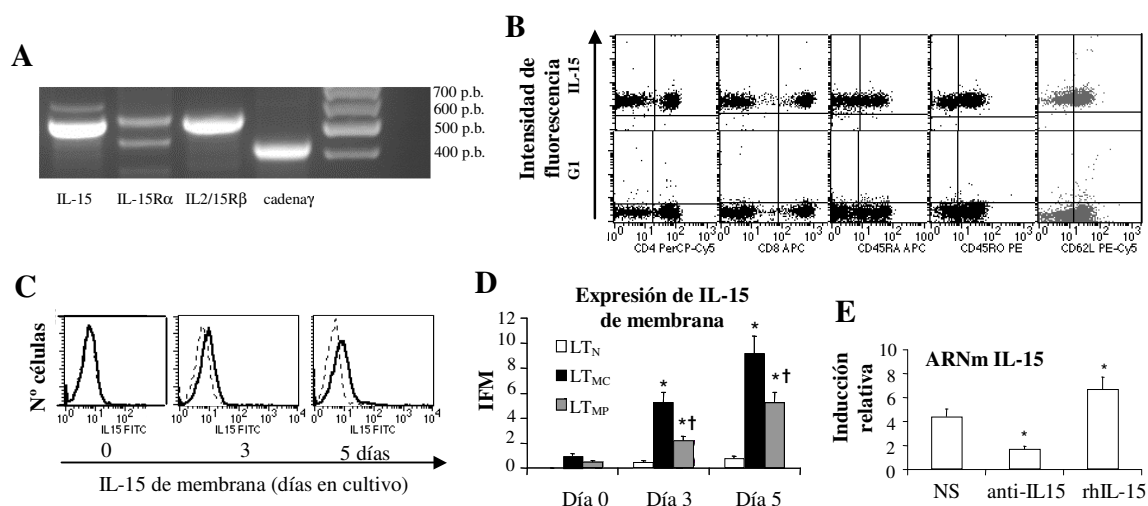


**Figura 26. Efecto de anticuerpos neutralizantes sobre la división homeostática *ex vivo* de los LT.** Las células marcadas con CFSE fueron cultivadas durante 12 días en placas de 96 pocillos con fondo en U a  $4 \times 10^5$  células/pocillo por triplicado. A, Se observa como disminuye la división de los LT al añadir los anticuerpos inhibidores (AcMc de ratón anti-IL-15, policlonal de cabra anti-IL-15Rα, constructo quimérico IL-15Rα-Fc y AcMc de ratón anti-IL-2Rβ), pero no con los anticuerpos control (isotipo control de ratón, IgG de cabra, IgG humana o anti-MHC class I de ratón). El análisis de subpoblaciones por citometría de flujo confirmó que este efecto se observa tanto en CD4 como en CD8. Cada barra representa la media aritmética  $\pm$  D.E. de 20 sujetos por grupo. \*  $p < 0,01$  vs la misma subpoblación cultivada en medio solo.

### 3. LOS LINFOCITOS T HUMANOS EXPRESAN CONSTITUTIVAMENTE IL-15 Y TODAS LAS CADENAS DE SU RECEPTOR.

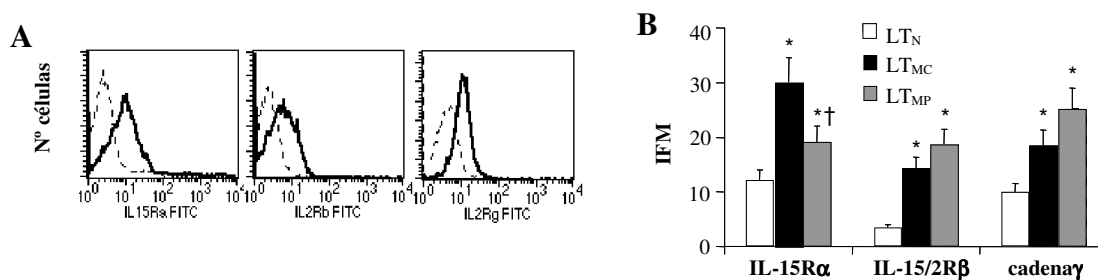
Estudiamos la expresión de IL-15 y su receptor en LT humanos, a nivel del ARNm y de la proteína:

- RT-PCR: se observó expresión de ARNm tanto de la IL-15 como de las tres cadenas de su receptor (IL-15Rα, IL-15/2Rβ, cadena común γ) (Fig. 27A).
- Citometría de flujo para IL-15: se observó expresión de la proteína IL-15 intracelular en linfocitos T permeabilizados. Esta expresión fue similar entre las distintas subpoblaciones: CD4, CD8, CD45RO y CD45RA (Fig. 27B). Aunque no observamos una expresión de IL-15 de superficie significativa en los LT totales no permeabilizados recién aislados (Fig. 27C), existía una mínima expresión en los LT<sub>MC</sub> (Fig. 27D). Después de 24 horas en cultivo, sí se observó una expresión significativa de IL-15 de superficie, la cual aumentó progresivamente hasta el 5º día, siendo los LT<sub>MC</sub> los que poseen una expresión máxima (Fig. 27, C y D).
- La RT-PCR cuantitativa en tiempo real de LT cultivados durante 48h en medio sin estímulo, mostró un aumento de la expresión de ARNm de la IL-15. Al añadir al cultivo un anticuerpo de ratón neutralizante anti-IL-15 este aumento fue significativamente menor. Por el contrario, en presencia de IL-15 recombinante (10 ng/ml), dicho aumento fue significativamente mayor (Fig. 27E).



**Figura 27. Expresión de IL-15 en linfocitos T humanos.** **A**, Expresión de ARNm de IL-15, IL-15R $\alpha$ , IL-15/2R $\beta$  y cadena común  $\gamma$  en los LT, determinado por RT-PCR. **B**, Diagramas de puntos representativos de la expresión de IL-15 intracelular (superiores) en las distintas subpoblaciones de LT recién aislados y su isotipo control (inferiores) seguidos de una tinción con marcadores de poblaciones: CD4, CD8, CD45RO, CD45RA y CD62L. Los diagramas de puntos negros muestran LT CD3<sup>+</sup> totales y los diagramas de puntos grises muestran LT CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>. **C**, Histogramas de citometría de flujo de LT no permeabilizados. No detectamos IL-15 en la superficie de los LT recién aislados, pero si se aprecia a los 3 y 5 días en cultivo. **D**, Análisis de la expresión de IL-15 en superficie de las subpoblaciones de LT recién aislados y tras 3 y 5 días en cultivo, determinado por citometría de flujo. Cada barra representa media aritmética  $\pm$  D.E. de 20 sujetos por grupo. \*  $p < 0,05$  vs LT<sub>N</sub>; †  $p < 0,05$  vs LT<sub>MC</sub>. **E**, Análisis por RT-PCR cuantitativa de la expresión del ARNm de IL-15 en LT cultivados durante 48 horas con medio (células no estimuladas, NS), con un anticuerpo anti-IL-15, o con IL-15 recombinante (rhIL-15) 10 ng/ml. Mostramos la inducción del ARNm en relación con la expresión de los LT recién aislados. Cada barra representa media aritmética  $\pm$  D.E. de 10 sujetos por grupo. \*  $p < 0,05$  vs LT cultivados en medio.

- Citometría de flujo para detectar las cadenas del receptor de la IL-15: Detectamos las tres cadenas del receptor de la IL-15 en LT humanos recién aislados (Fig. 28). Su expresión fue mayor en los LT<sub>M</sub> (tanto LT<sub>MC</sub> como LT<sub>MP</sub>) en comparación con los LT<sub>N</sub> (Fig. 28B). Los LT CD4 expresan mayores niveles de las tres cadenas del receptor en comparación con los LT CD8, lo cual puede ser atribuido a que en los LT CD4 la proporción de células CD45RO es mayor que en los LT CD8. Los LT<sub>MC</sub> expresan mayor cantidad de IL-15R $\alpha$  en comparación con los LT<sub>MP</sub>; por el contrario estos expresan mayores niveles de IL-15/2R $\beta$  y de la cadena común  $\gamma$ , aunque esta diferencia no resultó estadísticamente significativa (Fig. 28B).



**Figura 28. Expresión de las cadenas del receptor de la IL-15 en linfocitos T humanos recién aislados, determinada por citometría de flujo.** **A**, Histogramas representativos de la expresión de las tres cadenas: IL-15R $\alpha$ , IL-15/2R $\beta$  y cadena común  $\gamma$ , en LT totales. **B**, Análisis de la expresión del receptor de la IL-15 en las subpoblaciones LT<sub>N</sub>, LT<sub>MC</sub> y LT<sub>MP</sub>. Cada barra representa media aritmética  $\pm$  D.E. de 20 sujetos por grupo. \*  $p < 0,05$  vs LT<sub>N</sub>; †  $p < 0,05$  vs LT<sub>MC</sub>.

## ***DISCUSIÓN***

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar las relaciones existentes entre los distintos tipos celulares implicados en la AR y su posible implicación en la patogenia de la enfermedad. Para ello, hemos realizado diversos cocultivos estudiando algunas de las moléculas, como citoquinas y proteínas de membrana, que participan en estas interacciones.

Las citoquinas son muy importantes en la regulación de la respuesta inmune. En la AR existe una inflamación crónica relacionada con una alteración del equilibrio entre las distintas citoquinas. La relación de las distintas citoquinas en la AR es compleja, debido al elevado número de moléculas involucradas y a la redundancia y sinergismo en sus funciones (Uppal, Raghupathy et al. 2007).

Es interesante estudiar el perfil de expresión de citoquinas y el fenotipo de las células responsables del daño articular, puesto que el conocimiento de los factores implicados en el inicio y perpetuación de la inflamación, puede favorecer el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

## **1. IMPLICACIÓN DE LAS INTERACCIONES ENTRE LOS LINFOCITOS T Y FIBROBLASTOS SINOVIALES EN LA ARTRITIS REUMATOIDE.**

Todos los fibroblastos expresan constitutivamente IL-15 intracelular, pero la expresión constitutiva de IL-15 de superficie sólo la poseen los fibroblastos de ciertas localizaciones (Grabstein, Eisenman et al. 1994). Los fibroblastos de piel de sujetos sanos y los fibroblastos de líquido sinovial de pacientes con artrosis no expresan IL-15 de membrana, pero esta se induce mediante la estimulación con TNF $\alpha$  o IL-1 $\beta$  (Rappl, Kapsokafalou et al. 2001). La expresión constitutiva de IL-15 en la membrana de los fibroblastos humanos de bazo regula la diferenciación de las células progenitoras CD34+ hacia las células “natural killer” (Briard, Brouty-Boye et al. 2002). La IL-15 en la superficie de los fibroblastos del estroma de médula ósea contribuye al reclutamiento y expansión de los linfocitos T en la anemia aplásica (Wenxin, Jinxiang et al. 2005).

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que la interacción de los FSAR con los LT es importante para iniciar y perpetuar la inflamación articular de la AR. Los FSAR expresan constitutivamente IL-15 tanto intracelular como de membrana. Esta IL-15 constitutiva es biológicamente activa sobre los LT. De este modo, los LT en contacto con los FSAR se activan y a su vez inducen un aumento de la expresión de IL-15 en los FSAR, creándose un circuito cerrado que favorece la inflamación persistente en la AR.

En los cocultivos de FSAR/LT, los LTSPARo activan a los FSAR de forma más eficiente que los LTSPC y a su vez, se activan más fácilmente por efecto del contacto con los FSAR. Los LTSPARo poseen un estado previo de activación que favorece la respuesta mediada por contacto celular. Sin embargo, la expresión basal de CD69 y CD40L en los LTSPARo no fue superior a la de los LTSPC y la expresión basal de HLA-DR sólo estaba ligeramente aumentada. Se necesitan



más estudios para elucidar los mecanismos moleculares responsables del estado de preactivación de los LTSPARo. Las diferencias funcionales entre los LTSPARo y los LTSPC se han descrito previamente, pero se desconocen los mecanismos responsables de estas diferencias (Skapenko, Wendler et al. 1999). El estado de preactivación observado en los LTSPARo al inicio de la enfermedad, dejó de verse una vez que la actividad de la enfermedad había remitido.

Los LTLSAR recién aislados poseen una expresión basal de CD69 y CD25 aumentada, siendo más eficientes en la activación de los FSAR en comparación con los LTSPARo. Estos datos reflejan que la actividad de la enfermedad observada *in vivo* se correlaciona con lo detectado *in vitro*.

Los experimentos con soportes permeables sugieren que el contacto celular directo es fundamental para iniciar el diálogo entre los FSAR/LT. Una vez que esta relación intercelular se ha iniciado, los factores solubles como la IL-17, IL-6 e IL-8 son liberados al medio contribuyendo al circuito proinflamatorio.

Descartamos que los efectos observados sean atribuibles a una reacción alogénica debido a que un AcMc bloqueante anti-MHC clase I no mostró ningún efecto significativo. Además, trabajos previos de otros autores muestran que los cocultivos de fibroblastos y LT de diferentes donantes, no causan reacciones alogénicas. Esto es debido a la poca o nula expresión que poseen los fibroblastos de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (Corrigall, Solau-Gervais et al. 2000; Yamamura, Gupta et al. 2001). De hecho, Corrigall y col. observaron que la ausencia de CD80 y CD86 en los FS era responsable de la respuesta anérgica en los LT, de forma que no respondían a estímulos alogénicos, a pesar de que conservaban su respuesta a la IL-2 recombinante humana (Corrigall, Solau-Gervais et al. 2000).

Nuestra hipótesis inicial fue que la IL-15 de membrana de los FSAR es fundamental en la activación de los LT. Se confirmó con los experimentos realizados con anticuerpos neutralizantes frente a IL-15, IL-15R $\alpha$  e IL-2/15R $\beta$  y con el constructo quimérico IL-15R $\alpha$ -Fc. La expresión de IL-17, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  de los LT en cocultivo descendió significativamente en presencia de anticuerpos neutralizantes frente a la IL-15 y de los distintos componentes de su receptor, sugiriendo que la IL-15 es fundamental en la inducción de citoquinas de LT. De igual forma, el aumento de CD69 y CD25 es dependiente de IL-15 (Fig. 29).

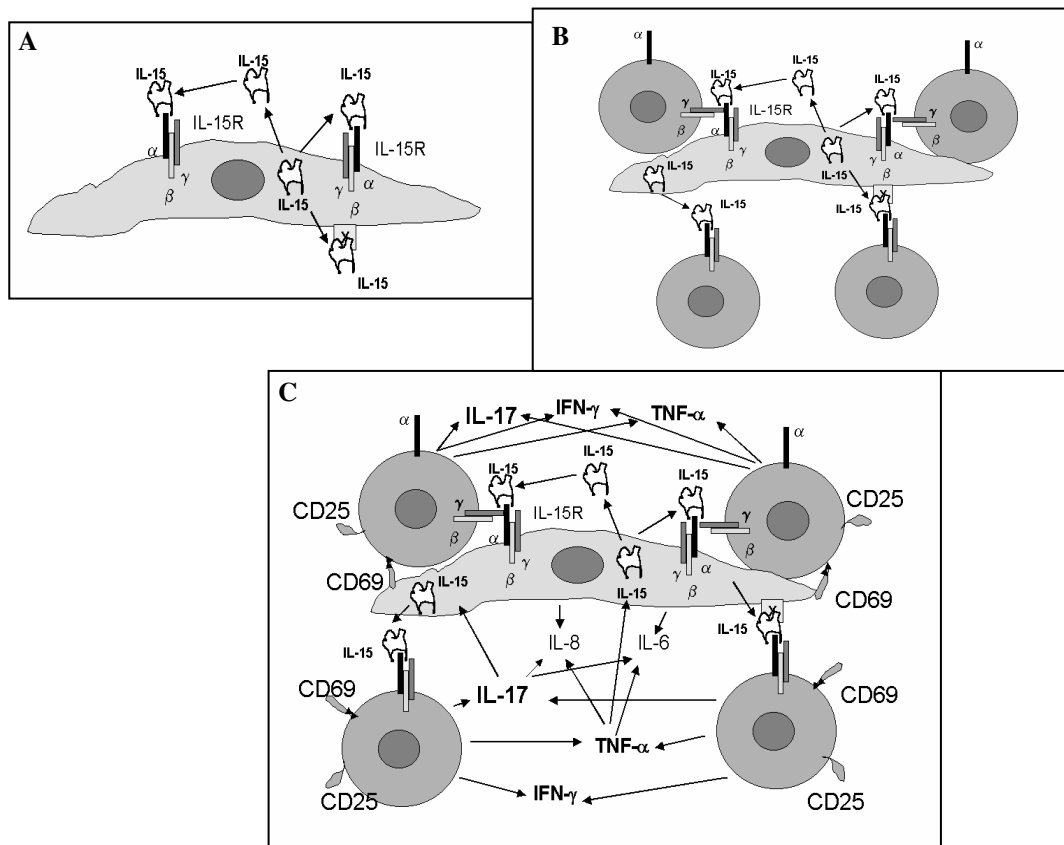
Al igual que otros autores (Giri, Ahdieh et al. 1994; Dubois, Mariner et al. 2002; Lodolce, Burkett et al. 2002), no pudimos detectar IL-15 soluble en los sobrenadantes de los cocultivos. Otros trabajos han descrito que los fibroblastos de diferentes localizaciones expresan constitutivamente IL-15, pero raramente han demostrado su secreción al espacio extracelular (Rappl, Kapsokafalou et al. 2001; Briard, Brouty-Boye et al. 2002; Lodolce, Burkett et al. 2002). La IL-15 actúa a través de un receptor heterotrimérico que posee una cadena específica de alta afinidad de unión (IL-15R $\alpha$ ) además de las cadenas IL-2R $\beta$  y la común  $\gamma$  encargadas de transducir la señal (Giri, Ahdieh et al. 1994). La cadena IL-15R $\alpha$  posee una elevada afinidad por la IL-15

( $K_d=10$  pM) en contraste con la afinidad que posee el IL-2R $\alpha$  por la IL2 ( $K_d=10$  nM) (Lodolce, Burkett et al. 2002). Se ha propuesto que debido a esta alta afinidad, la IL-15 secretada es rápidamente secuestrada por el IL-15R $\alpha$  presente tanto en las células productoras como en las células vecinas, lo cual impide la detección de IL-15 en sobrenadantes de cultivo (Barzegar, Meazza et al. 1998; Dubois, Mariner et al. 2002) (Fig. 29). Este mecanismo implica una activación tanto autocrina como paracrina y se ha denominado “recirculación intercelular de la IL-15” (Barzegar, Meazza et al. 1998). Además, Dubois y col. han demostrado que la mayoría de la IL-15 detectada en la superficie de la membrana está unida al IL-15R $\alpha$  (Fig. 29) y este complejo IL-15/IL-15R $\alpha$  es biológicamente activo en células vecinas a través de contacto celular directo. De hecho, IL-15R $\alpha$  es capaz de presentar IL-15 en *trans* a células que expresan las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  del receptor (Dubois, Mariner et al. 2002) (Fig. 29). En la membrana, el complejo IL-15-IL-15R $\alpha$  tiene una actividad biológica más amplia que la IL-15 soluble, debido a que la señal inducida en *trans* por el complejo IL-15/IL-15R $\alpha$ , puede estimular eficientemente a concentraciones picomolares la proliferación de células vecinas, que expresan las cadenas  $\beta\gamma$ - y/o el receptor completo IL-15R- $\alpha\beta\gamma$  (Dubois, Mariner et al. 2002). De hecho, la presencia de IL-15R $\alpha$  unido a IL-15 en la membrana es sinónimo de una secreción activa de IL-15 (Fig. 29) y los niveles de expresión de la IL-15 en la membrana en una población celular determinada reflejan la velocidad de internalización del complejo IL-15-IL-15R $\alpha$ . También se ha descrito que la IL-15 puede interactuar con la membrana plasmática independientemente de su receptor (Fig. 29). Esto podría ocurrir indirectamente a través de interacciones con receptores no identificados o bien directamente de dos maneras: (a) por el anclaje directo en la membrana de una isoforma de IL-15 con un péptido señal N terminal modificado o (b) por la anexión de un anclaje GPI en el C terminal de la IL-15 (Neely, Epelman et al. 2004). Es decir, en contraposición con la IL-2, la IL-15 puede ser expresada en la membrana celular, donde es capaz de realizar funciones biológicas a través de mecanismos dependientes de contacto celular (Rappl, Kapsokafalou et al. 2001; Briard, Brouty-Boye et al. 2002).

Debido a que la IL-15 no se secreta al espacio extracelular de forma soluble y permanece anclada a la membrana plasmática; para que la IL-15 realice su función es necesario el contacto celular directo (Fig. 29).

Mediante la utilización de anticuerpos bloqueantes anti-CD54 demostramos que la ICAM-1 (CD54) también está implicada en la activación de los LT. En trabajos previos en donde se estudió el efecto de la adhesión de LFA-1/ICAM-1 en la activación de los LT de sangre periférica (Sancho, Yanez-Mo et al. 1999) y leucocitos (Lee, Del Sorbo et al. 2004) también se observó este efecto. Es difícil determinar si el efecto del CD54 está relacionado exclusivamente con la adhesión o si el CD54 tiene un efecto activador intrínseco (Poudrier and Owens 1994; Holland and Owens 1997). Al neutralizar simultáneamente la IL-15 y el CD54 obtuvimos un efecto sinérgico, sobre el

bloqueo de la interacción entre LT/FSAR. De igual forma, al utilizar un AcMc anti-CD11a disminuye la activación de los FSAR inducida por el cocultivo con los LT. Ello sugiere que las integrinas  $\beta 2$  forman parte activa en este sistema de cocultivo y enfatiza la importancia de la adhesión en la interacción entre los LT/FSAR.



**Figura 29. La IL-15 de los fibroblastos estimula a los linfocitos T a través de contacto celular directo.** **A,** Los fibroblastos sinoviales de artritis reumatoide (FSAR) expresan constitutivamente IL-15 de membrana. La mayoría de la IL-15 de membrana parece estar unida al IL-15R $\alpha$ . Este mecanismo se favorece gracias a la alta afinidad que posee el IL-15R $\alpha$ , el cual secuestra rápidamente la IL-15 secretada. De forma alternativa, la IL-15 de superficie puede estar anclada directamente a la membrana plasmática a través de un péptido señal o GPI o indirectamente unida a receptores que no conocemos todavía (estos tres mecanismos alternativos están representados como "X"). **B,** La IL-15 unida al IL-15R $\alpha$  en la membrana de los FSAR es capaz de estimular a los linfocitos T (LT) vecinos en *trans*, a través de IL-2R $\beta$  y la cadena  $\gamma$  común. Además, la IL-15 secretada y la IL-15 anclada a la membrana plasmática pueden estimular a los LT adheridos en *cis* por la unión del IL-15R $\alpha$  del LT. El IL-15R $\alpha$  del LT podría competir con el IL-15R $\alpha$  de los fibroblastos por la IL-15 secretada. **C,** La IL-15 de los fibroblastos provoca un aumento de expresión de CD69, CD25, IL-17, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  de los LT que contribuye a un mayor aumento de la IL-15 e induce la secreción de IL-6 e IL-8 de los fibroblastos. Esto constituye un circuito cerrado que favorece la perpetuación del proceso inflamatorio.

La proteína de membrana de linfocitos T CD69 es importante en la activación contacto dependiente de los FSAR, ya que al añadir un AcMc frente al CD69 disminuyó de forma moderada el aumento observado de la expresión de IL-15, IL-6, IL-8 y CD54 de los FSAR en el cocultivo con los LT. Sin embargo, existen discrepancias sobre cuál puede ser la función del CD69 entre estudios *in vitro* frente a modelos animales *in vivo*. En estudios previos *in vitro* se ha

observado la implicación del CD69 en la activación de los linfocitos T a través del contacto celular (Isler, Vey et al. 1993; McInnes, Leung et al. 1997). Por el contrario, en ratones knockout CD69, se sugiere que el CD69 puede tener una función antiinflamatoria mediada por el aumento de producción de TGF- $\beta$ , que disminuye la producción de citoquinas proinflamatorias (Sancho, Gomez et al. 2003).

Del mismo modo, observamos la importancia de las citoquinas derivadas del linfocito T, como el TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  en la activación del FSAR. En los cocultivos FSAR/LT en los que se añadieron AcMc específicos frente a estas citoquinas, se logró disminuir la activación de los FSAR. También observamos que la inducción de IL-17 en los cocultivos es importante en el mantenimiento del circuito de retroalimentación. Al añadir un AcMc que bloquea a la IL-17, disminuyó significativamente la producción de IL-6 e IL-8 por los FSAR y se produjo una inhibición moderada en el aumento de la expresión de CD54 e IL-15. La IL-17 es una citoquina producida por los LT activados. Se ha descrito que existen niveles elevados de IL-17 en el líquido sinovial de pacientes con AR, pero no en el líquido sinovial de pacientes con artrosis (Kotake, Udagawa et al. 1999; Ziolkowska, Koc et al. 2000). Además, los LT CD4CD45RO existentes en el tejido sinovial de pacientes con AR son inmunoreactivos frente a los anticuerpos anti-IL-17 (Kotake, Udagawa et al. 1999) y también, piezas de cultivo de sinoviales de AR producen IL-17 (Chabaud, Fossiez et al. 1998). Estos datos en conjunto con los mostrados en nuestro sistema de cocultivo, sugieren que el bloqueo de la IL-17 podría ayudar a controlar la actividad.

Una vez diagnosticada la enfermedad, nuestros pacientes recibieron un tratamiento oral con MTX. Realizamos los mismos experimentos en el momento en que la actividad de la enfermedad estaba controlada y observamos que el control de la enfermedad se acompaña de un cambio en la capacidad de los linfocitos T de sangre periférica para activar y ser activados por los FSAR. Trabajos previos han demostrado el efecto del MTX *in vivo*. En un modelo animal de ratón con artritis inducida por colágeno (CIA), se observó una disminución del reclutamiento de los LT a la articulación (Cronstein, Naime et al. 1993). La mejoría clínica con MTX en la AR ha sido asociada con una disminución significativa en el infiltrado de LT presentes en la membrana sinovial (Balsa, Gamallo et al. 1993; Dolhain, Tak et al. 1998), y con la disminución de la migración y reclutamiento de neutrófilos en la articulación (Kraan, de Koster et al. 2000).

En conclusión, la IL-15 expresada constitutivamente en la membrana de los FSAR es capaz de estimular a LT en reposo. Los LT estimulados inician la expresión de TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-17, las cuales estimulan la producción de IL-15, IL-6 e IL-8 en FSAR, generando un circuito cerrado positivo (Fig. 29). Los LTSPARo contribuyen particularmente a este efecto ya que muestran una mayor respuesta en comparación con los LTSPC. El diálogo bidireccional entre los LT/FSAR puede favorecer a la inflamación residual en los pacientes con AR que no responden al tratamiento frente a TNF $\alpha$ . El estado de activación basal que poseen los linfocitos T al inicio de la

enfermedad disminuye y se regula *in vivo* por los FAMES a medida que remite la actividad de la enfermedad.

## **2. IMPLICACIÓN DE LAS INTERACCIONES ENTRE LOS LINFOCITOS T Y MONOCITOS EN LA PATOGENIA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE: OSTEOCLASTOGÉNESIS.**

Además de la implicación de los linfocitos T en el mantenimiento de la inflamación de la membrana sinovial debido al diálogo con los FSAR, también nos propusimos estudiar su función en la formación de osteoclastos. En este trabajo observamos que los LTSPARo y LTL SAR, pero no de LTSPC, poseen una expresión en membrana significativa de RANKL e IL-15. Al mismo tiempo, los LTSPARo y los LTL SAR, pero no los LTSPC, fueron capaces de inducir osteoclastogénesis en cocultivos con monocitos autólogos.

Previamente se había descrito que el RANKL media osteoclastogénesis en cultivos de células mononucleares de sangre periférica sin estimular de pacientes con artritis psoriásica (Ritchlin, Haas-Smith et al. 2003), mieloma múltiple (Colucci, Brunetti et al. 2004) y osteoporosis postmenopáusica (D'Amelio, Grimaldi et al. 2005), pero no se ha descrito este proceso en pacientes con AR. Sin embargo, sí se ha detectado la expresión de RANKL en los linfocitos T de tejido sinovial (Kotake, Udagawa et al. 2001; Dai, Nishioka et al. 2004) y de líquido sinovial de pacientes con AR (Kanamaru, Iwai et al. 2004), junto con niveles elevados de la forma soluble de RANKL (RANKLs) y disminuidos de OPG en el líquido sinovial (Kotake, Udagawa et al. 2001). Además, Kotake y col. demostraron que los LT humanos activados por mitógenos inducen la formación de osteoclastos en monocitos humanos de forma dependiente de RANKL (Kotake, Udagawa et al. 2001). En este trabajo ampliamos esta observación al mostrar por primera vez la transformación osteoclástica de monocitos, inducida por LTSPARo y LTL SAR autólogos sin estímulos exógenos adicionales.

Los monocitos/macrófagos pueden realizar dos funciones: como progenitores de los osteoclastos y también como fuente de citoquinas osteoclastogénicas (Zou, Hakim et al. 2001; Kitaura, Sands et al. 2004). En este trabajo hemos observado que tanto los MoSPARo recién aislados como los MoLSAR, pero no los MoSPC, expresan significativamente IL-15 de membrana. Además, los niveles elevados de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  que observamos en los cocultivos de monocitos/LT de pacientes con AR, en comparación con los cocultivos de los controles sanos, reflejan también la mayor activación de los monocitos de los pacientes con AR. Este estado de activación de los monocitos puede facilitar la estimulación de los LT en el cocultivo y por tanto la osteoclastogénesis.

En nuestro sistema, los experimentos con OPG-Fc y con anticuerpos neutralizantes demostraron que el RANKL es fundamental en la osteoclastogénesis mediada por LT *ex vivo* y que

las citoquinas IL-17, IL-15, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  son también importantes, contribuyendo a potenciar este efecto. Este dato es consistente con observaciones previas que indican que en la osteoclastogénesis mediada por inflamación existe una cooperación de citoquinas (D, Ireland et al. 2004; Lubberts, Koenders et al. 2005; Wei, Kitaura et al. 2005). Se ha observado en experimentos con ratones knockout RANKL, que se requiere un nivel constitutivo mínimo de RANKL para que se produzca la osteoclastogénesis, (Pettit, Ji et al. 2001) y el efecto de una cantidad mínima de RANKL es potenciado por las citoquinas proinflamatorias (Lam, Takeshita et al. 2000). Por el contrario, también se ha descrito que el TNF $\alpha$  es capaz de inducir osteoclastogénesis independientemente de RANKL (Kobayashi, Takahashi et al. 2000). El TNF $\alpha$  es una de las citoquinas más importantes implicadas en la osteolisis inflamatoria (Redlich, Hayer et al. 2002; Ritchlin, Haas-Smith et al. 2003) y coopera de forma sinérgica con RANKL (Lam, Takeshita et al. 2000). De hecho, el TNF $\alpha$  induce la síntesis de RANKL en las células del estroma de la médula ósea (Lam, Takeshita et al. 2000) y el RANKL favorece la expresión de TNF $\alpha$  en precursores de osteoclastos (Zou, Hakim et al. 2001). También se ha descrito que la acción de TNF $\alpha$  sobre la expresión de RANKL está mediada por IL-1 $\beta$  (Wei, Kitaura et al. 2005). La hipótesis de cooperación entre las citoquinas osteoclastogénicas se respalda con observaciones *in vivo*; el bloqueo de TNF $\alpha$  o de IL-1 $\beta$  por separado, no previene completamente la erosión periarticular de la artritis inflamatoria en un modelo murino, mientras que la administración de ambas citoquinas combinadas es significativamente más efectiva (Zwerina, Hayer et al. 2004).

La IL-17 es otra de las citoquinas implicadas en la osteoclastogénesis. La IL-17 contribuye a este proceso de distintas formas: altera el equilibrio entre RANKL:OPG (Lubberts, Koenders et al. 2005); favorece la destrucción articular mediada por IL-1; y su neutralización puede evitar la artritis TNF $\alpha$  dependiente (Koenders, Lubberts et al. 2005). La administración de un anticuerpo anti-IL-17 puede ser efectiva en la AR (Lubberts, Koenders et al. 2005), especialmente en pacientes que posean niveles elevados de IL-17 lo cual podría atenuar la respuesta de otros agentes biológicos como el anti-TNF $\alpha$ .

Los experimentos con soportes permeables nos indican que el contacto celular directo es necesario para iniciar el diálogo entre los LT y los monocitos, responsables de la osteoclastogénesis. Una vez que el diálogo intercelular es iniciado, son liberados al medio RANKLs, IL-17, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  que contribuyen al efecto osteoclastogénico, mientras que la OPG actúa neutralizando al RANKL. En nuestros sobrenadantes de cocultivo de pacientes con AR la relación OPG:RANKL se encontró disminuida, lo cual favorece la formación de osteoclastos (Lacey, Timms et al. 1998).

Se ha descrito previamente que la IL-15 aumenta la diferenciación a osteoclastos, sin embargo, aunque la IL-2 tiene muchas similitudes con la IL-15, carece de efecto osteoclastogénico (Ogata, Kukita et al. 1999). En nuestro sistema, la IL-15 de membrana de los LT y monocitos de pacientes con AR parece contribuir de manera importante en la osteoclastogénesis *ex vivo*.

Varios estudios indican que la progresión radiológica en la AR se relaciona directamente con las fluctuaciones de la actividad clínica (Welsing, Landewe et al. 2004). De hecho, el tratamiento precoz y agresivo con FAMEs modifica la conocida asociación de los alelos HLA clase II con la progresión del daño articular en la AR. El efecto del tratamiento precoz parece ser independiente de otros factores pronóstico, como el factor reumatoide y la actividad basal de la enfermedad, indicando que la iniciación temprana de FAMEs puede modificar la alteración del sistema inmune en la AR (Lard, Boers et al. 2002). En consonancia con lo anterior, nosotros hemos observado que el número de erosiones nuevas en el primer año fue significativamente menor en los pacientes que alcanzaron remisión completa. Nuestros experimentos con LTSPARo y MoSPARo que recibieron MTX oral, solo o en combinación con bajas dosis de prednisona, muestran que el control de la enfermedad se asocia con un descenso de la expresión de RANKL e IL-15 de superficie, así como con un descenso de la osteoclastogénesis *ex vivo*. Al mismo tiempo, la expresión basal de superficie de RANKL en LT y de IL-15 en LT y monocitos así como la osteoclastogénesis *ex vivo* basal, no se asociaron con el número de erosiones óseas desarrolladas en el primer año de seguimiento. Ello refleja el hecho de que el tratamiento con FAMEs es capaz de modificar el curso natural de la enfermedad y prevenir la destrucción articular (Lard, Boers et al. 2002), e indica que la expresión basal de RANKL e IL-15 de superficie, así como la osteoclastogénesis *ex vivo* son marcadores de actividad de la enfermedad y no se pueden considerar como factores predictivos independientes de progresión radiológica.

Estos resultados amplían nuestro conocimiento de la patogenia de la erosión del hueso en la AR y nos proporcionan una base experimental para el empleo de agentes biológicos anticitoquinas o sus combinaciones, en pacientes que no responden a la terapia convencional.

### **3. PRIMERA DESCRIPCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS EN FIBROBLASTOS DE LÍQUIDO SINOVIOL DE ARTRITIS REUMATOIDE Y EN LINFOCITOS T HUMANOS.**

#### **3.1 Los fibroblastos de líquido sinovial de artritis reumatoide expresan TRAILR2 (DR5) que es funcionalmente activo.**

Otro de los posibles agentes terapéuticos en la AR que focaliza su acción en la supervivencia de los fibroblastos sinoviales, es la administración de un anticuerpo anti-DR5. La AR se caracteriza por una hiperplasia de los fibroblastos sinoviales que invaden y erosionan el cartílago y el hueso subcondral. Este fenómeno puede deberse a una disminución de la susceptibilidad a la apoptosis (Pap, Muller-Ladner et al. 2000). Una terapia efectiva para ratones con CIA es la administración del ligando del Fas, que induce apoptosis (Zhang, Yang et al. 1997), pero se ha demostrado que produce una toxicidad sistémica severa (Walczak, Miller et al. 1999).

Por ello, se buscan nuevas terapias que controlen la inflamación y el crecimiento de fibroblastos en la AR sin causar inmunosupresión o toxicidad en tejidos sanos.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que los fibroblastos de membrana sinovial de pacientes con AR (FSAR) y algunos del líquido sinovial de pacientes con AR (FLSAR) expresan DR5 y sufren apoptosis cuando están expuestos a un anticuerpo agonista anti-DR5; en cambio, los fibroblastos de líquido sinovial y de membrana sinovial de pacientes con otras artropatías y los fibroblastos de piel de sujetos sanos no expresan DR5 y son resistentes a la apoptosis mediada por anti-DR5. Estos datos son consistentes con trabajos previos de Ichikawa y col., los cuales muestran además que un AcMc anti-DR5 previene la artritis erosiva en un modelo murino en el que se injerta tejido sinovial de paciente con AR (Ichikawa, Liu et al. 2003). Es importante destacar que el anticuerpo anti-DR5 utilizado por Ichikawa y col. no parece producir lesiones hepáticas (Ichikawa, Liu et al. 2001; Ichikawa, Liu et al. 2003) y es por lo tanto un buen sustituto de la terapia con TRAIL soluble, que induce apoptosis en hepatocitos humanos sanos (Jo, Kim et al. 2000). Una ventaja adicional al usar una diana específica frente a DR5 es la falta de interferencia con otros receptores de TRAIL como la OPG. La OPG inhibe osteoclastogénesis al unirse al RANKL y aumenta la densidad del hueso *in vivo* (Min, Morony et al. 2000). Se ha descrito que el TRAIL soluble bloquea la actividad antiosteoclastogénica de la OPG *in vitro* (Emery, McDonnell et al. 1998); por lo que al administrar TRAIL soluble en pacientes con AR, potencialmente, se aceleraría la osteoporosis (Ichikawa, Liu et al. 2003).

Aunque el origen de los FLSAR es incierto, su crecimiento se describió hace bastantes años (Castor and Dorstewitz 1966; Mackay, Panayi et al. 1974). Una de las propuestas es que estos fibroblastos se disgregan de la membrana sinovial y flotan libremente en el líquido sinovial (Mackay, Panayi et al. 1974). Neidhart y col. han demostrado que los FLSAR tienen un potencial invasivo *in vitro* e *in vivo* (Neidhart, Seemayer et al. 2003). Debido a que algunos de los FLSAR expresan TRAIL-R2 y pueden ser susceptibles a la apoptosis mediada por TRAIL-R2, la terapia anti-DR5 podría incluso ser diana para la acción destructiva de estas células en el cartílago.

Se observó que crecían fibroblastos en 35 de los 50 líquidos sinoviales de AR, y sólo 26 de estas líneas de fibroblastos expresaban DR5. Parece ser que los fibroblastos que crecen del líquido sinovial de pacientes con AR son de al menos 2 diferentes linajes. Aquellos que expresan la proteína DR5, comparten esta característica con las células transformadas y con los fibroblastos de membrana sinovial de AR (Ichikawa, Liu et al. 2003), y posiblemente deriven de la membrana sinovial.

El origen de los FLSAR que son DR5- es incierto. Se necesitan estudios adicionales para caracterizar a estas células. Debido a que todos nuestros pacientes con AR que poseían fibroblastos en el líquido sinovial DR5- tenían la enfermedad activa, no creemos que las células DR5- deriven de una membrana sinovial “quemada”. En algunos pacientes, los FLSAR DR5- podrían ser de origen dérmico, debido a que al aspirar el líquido de la articulación se perfora la piel, y los



fibroblastos de piel se pueden quedar adheridos en la aguja y ser transferidos al tubo de recolección. Alternativamente, y como sugiere Neidhart y col. (Neidhart, Seemayer et al. 2003), los fibroblastos flotantes en el líquido sinovial pueden derivar de la erosión de la médula ósea. Además, Jones y col. (Jones, English et al. 2004) han descrito la presencia de células progenitoras multipotenciales mesenquimales en el líquido sinovial de pacientes de AR y de artrosis, los cuales pueden derivar del deterioro del cartílago, hueso, sinovio, pericitos vasculares, periostio o médula ósea (Jones, English et al. 2004). Estas células del líquido sinovial pueden dar lugar a fibroblastos de líquido sinovial, como sugirió Neidhart y col. (Neidhart, Seemayer et al. 2003).

En resumen, la expresión selectiva del DR5 funcionalmente activo en los fibroblastos del líquido sinovial y de la membrana sinovial de pacientes con AR, sugiere que un anticuerpo anti-DR5, que no induce hepatotoxicidad, puede ser una buena alternativa terapéutica para la AR. El DR5 como marcador de fibroblastos sinoviales de pacientes con AR nos ofrece una forma fácil y cómoda de determinar el origen de estas células.

### **3.2 Los linfocitos T humanos expresan constitutivamente IL-15, que induce proliferación *ex vivo* por mecanismos autocrinos/yuxtacrinos.**

Por último, en este trabajo mostramos que los LT humanos de controles sanos expresan constitutivamente IL-15 tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína, como ya se había descrito previamente (Thurkow, van der Heijden et al. 1997; Azimi, Brown et al. 1998; Neely, Robbins et al. 2001). Lo novedoso de nuestros experimentos es que mostramos por primera vez que la IL-15 en ellos es funcionalmente activa: en un sistema de cultivo *ex vivo*, la IL-15 endógena induce proliferación homeostática través de un circuito autocrino/yuxtacrino. En paralelo, la IL-15 del LT crea un mecanismo de retroalimentación que aumenta la producción del ARNm de la IL-15 y su expresión en membrana. Estos datos son consistentes con lo publicado por Lodolce y col., es decir, la señal mediada por el IL-15R $\alpha$  induce un circuito cerrado de retroalimentación positiva sobre la producción de IL-15 (Lodolce, Burkett et al. 2001).

Pilling y col. (Pilling, Akbar et al. 2000) demostraron que los LT cultivados a una densidad celular alta ( $4 \times 10^6$  células/ml) son capaces de sobrevivir durante largos periodos de tiempo en ausencia de factores de supervivencia. Nuestros resultados confirman y extienden esta observación, mostrando que una elevada densidad celular favorece la proliferación homeostática *ex vivo* de los LT en cultivo. Los experimentos en los que cultivamos el mismo número de LT totales en el mismo volumen de medio, pero aumentando el área de cultivo y los experimentos con soportes permeables, indican que la proliferación homeostática no es atribuible a factores solubles o a contaminantes exógenos. Además las citoquinas IL-2, IL-7 e IL-15 se encontraron por debajo de 10 pg/ml en los sobrenadantes de cultivo.

Los experimentos con anticuerpos neutralizantes, tanto directamente dirigidos a la IL-15 como a las cadenas de su receptor, inequívocamente sugieren que, a pesar de que no detectamos IL-15 en sobrenadantes, esta citoquina es fundamental en la división homeostática *ex vivo* de los LT. Previamente ya se había descrito que aunque la IL-15 es constitutivamente expresada por varias líneas celulares, la secreción al espacio extracelular es muy difícil de detectar (Lodolce, Burkett et al. 2002). En cambio, la IL-7, una citoquina muy importante en la homeostasis de linfocitos T *in vivo*, es fácilmente detectada por ELISA después de su secreción. La fuente principal de IL-7 son las células del estroma y del epitelio de varias localizaciones, mientras que no se ha detectado IL-7 en LT de sujetos sanos (Fry and Mackall 2002).

El IL-15R $\alpha$  unido a IL-15 en la superficie celular es internalizado y reciclado, de modo que el nivel de expresión de IL-15 en la superficie es el resultado de un equilibrio entre la secreción de la IL-15 y la internalización del complejo IL-15/IL-15R $\alpha$  (Dubois, Mariner et al. 2002). En este estudio hemos observado que la expresión basal de IL-15 de membrana en LT totales de sangre periférica recién aislados está por debajo del nivel de detección por citometría de flujo, y sólo detectamos una expresión muy baja en la membrana de LT<sub>MC</sub>. La expresión en membrana de IL-15 aumentó significativamente en cultivo, debido a un circuito autocrino gracias al cual los LT estimulan su propia producción de IL-15 y modifican el equilibrio entre la secreción e internalización de la misma.

El análisis por citometría de flujo demostró que la división homeostática *ex vivo* se produce tanto en LT CD4 como en CD8, y que los anticuerpos anti-IL-15 disminuyen la proliferación en ambas subpoblaciones. Es importante notar que los LT CD4 humanos en contraposición con los LT CD4 de ratones, son capaces de responder y proliferar en respuesta a la IL-15 independientemente de TCR (Geginat, Sallusto et al. 2001).

Los LT de sangre periférica humanos, tanto en CD4 como en CD8, se dividen en dos subpoblaciones, los LT<sub>N</sub> y los LT<sub>M</sub>. A su vez, los LT<sub>M</sub> poseen al menos dos subpoblaciones funcionalmente diferentes: 1) LT<sub>MC</sub> no polarizados sin función efectora (CD62L+ y CCR7+), que se localizan en las áreas T de los órganos linfoides secundarios; 2) LT<sub>MP</sub> polarizados (CD62L- y CCR7-) con función efectora y capacidad de migrar a tejidos no linfoides (Sallusto, Lenig et al. 1999). En nuestro sistema, el análisis fenotípico por citometría de flujo demuestra que las células que más se dividen son las que expresan marcadores de membrana de LT<sub>MC</sub>, lo cual es consistente con la observación previa según la cual los LT cultivados se pueden mantener en un estado de memoria no polarizada en presencia de IL-15 (Manjunath, Shankar et al. 2001).

Aunque la expresión de IL-15 intracelular es comparable entre las distintas subpoblaciones, los LT<sub>MC</sub> recién aislados muestran unos niveles mayores de IL-15R $\alpha$  e IL-15 de membrana. Como los LT<sub>MC</sub> son los que poseen la mayor expresión de IL-15R $\alpha$  compiten con ventaja por la IL-15 con las demás subpoblaciones, captando más IL-15 gracias a la alta afinidad del receptor y la baja producción fisiológica de IL-15 por los LT. Esta competición favorecería que

los LT<sub>MC</sub> se dividan más en los cultivos de LT totales. Dicha competición sería posible porque parece que la IL-15 humana tiene al menos dos sitios de unión para el IL-15R $\alpha$ , permitiendo que el complejo IL-15R $\alpha$ /IL-15 de un LT estimule el IL-15R $\alpha$  de otro LT vecino (Bernard, Harb et al. 2004). Además, la IL-15 unida a la membrana participa en el fenómeno de señalización reversa (Neely, Epelman et al. 2004). Por lo tanto, cuando la IL-15 es capturada por dos moléculas de IL-15R $\alpha$  en la membrana de dos LT diferentes, puede activar a ambas células simultáneamente (Budagian, Bulanova et al. 2004). Este mecanismo puede amplificar la sensibilidad del LT a la IL-15 favoreciendo la competición de LT<sub>MC</sub> con otras subpoblaciones.

Se ha demostrado que el período de latencia que precede a la división celular depende de la naturaleza y fuerza del estímulo. Geginat y col. han descrito que los LT<sub>N</sub> estimulados con células dendríticas pulsadas con un superantígeno, crecen rápidamente; la primera división ocurre después de un periodo de latencia de 40 horas y las células seguidamente se dividen rápidamente, cada 10 horas aproximadamente. En cambio, cuando las células son expuestas a una combinación de citoquinas, los LT se dividen con cinéticas más lentas, la primera división se observa después de 72 horas y el tiempo de división es cada 30 horas (Geginat, Sallusto et al. 2001). En nuestro sistema, las células que expresan niveles más bajos de IL-15R $\alpha$ , necesitarían un tiempo más largo para conseguir que el asa de retroalimentación positiva iniciado por la IL-15 llegue al nivel umbral necesario para iniciar la división celular.

En conclusión, en condiciones fisiológicas la IL-15 expresada por los LT puede contribuir al mantenimiento del número de LT en áreas donde los LT se encuentran agregados de manera natural. Por ejemplo, podría promover la persistencia de LT<sub>MC</sub> en ausencia prolongada de antígeno (Zaph, Uzonna et al. 2004). En estos casos, los LT del paracortex de los ganglios linfáticos se encuentran en contacto muy cercano unos de otros, debido a la tremenda disminución en el número de células presentadoras de antígeno locales que ocurre en estas circunstancias (Sallusto and Lanzavecchia 2002). Además, la IL-15 de los LT puede jugar un papel importante en la interacción de los LT con otros linajes celulares (Miranda-Carus, Balsa et al. 2004).

## ***CONCLUSIONES***

De todo lo expuesto en este trabajo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Las citoquinas IL-15, IL-8 e IL-6 producidas por los fibroblastos sinoviales de artritis reumatoide contribuyen a que se induzca la expresión de las citoquinas proinflamatorias, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-17, de los linfocitos T de sangre periférica de artritis reumatoide de inicio a través de mecanismos dependientes de contacto celular. A su vez, estas citoquinas estimulan la producción de IL-15, IL-8 e IL-6 por parte de los fibroblastos sinoviales de artritis reumatoide. De esta forma se crea un circuito cerrado que favorece la inflamación persistente en la sinovial reumatoide.
2. Los linfocitos T de pacientes con artritis reumatoide son capaces, en ausencia de estímulos exógenos, de inducir la diferenciación osteoclastogénica en los monocitos autólogos a través de mecanismos contacto dependientes, participando activamente en la erosión del hueso.
3. El estado de activación basal que poseen los linfocitos T al inicio de la enfermedad disminuye y se regula *in vivo* por los FAMEs a medida que remite la actividad de la enfermedad.
4. Algunos de los fibroblastos que crecen a partir del líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide, expresan, al igual que los fibroblastos de membrana sinovial de pacientes con AR, TRAIL-R2 de membrana funcionalmente activo. Un anticuerpo agonista anti-TRAIL-R2 no hepatotóxico, podría ser una buena alternativa terapéutica en pacientes con artritis reumatoide.
5. Los linfocitos T humanos expresan constitutivamente IL-15, la cual es funcionalmente activa y actúa a través circuitos autocrinos/paracrinos promoviendo la proliferación homeostática de los linfocitos T *ex vivo*.

## ***BIBLIOGRAFÍA***

- Aarvak, T. and J. B. Natvig (2001). "Cell-cell interactions in synovitis: antigen presenting cells and T cell interaction in rheumatoid arthritis." *Arthritis Res* 3(1): 13-7.
- Abraham, D., S. Lupoli, et al. (1991). "Expression and function of surface antigens on scleroderma fibroblasts." *Arthritis Rheum* 34(9): 1164-72.
- Akbar, A. N., N. Borthwick, et al. (1993). "The significance of low bcl-2 expression by CD45RO T cells in normal individuals and patients with acute viral infections. The role of apoptosis in T cell memory." *J Exp Med* 178(2): 427-38.
- Alamanos, Y. and A. A. Drosos (2005). "Epidemiology of adult rheumatoid arthritis." *Autoimmun Rev* 4(3): 130-6.
- Albani S, C. D. (1997). "Etiology and Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis." *Arthritis and Allied Conditions*. Koopman W, Ed. Williams & Wilkins (Baltimore, MD, USA): 979-992.
- Arnett, F. C., S. M. Edworthy, et al. (1988). "The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 31(3): 315-24.
- Azimi, N., K. Brown, et al. (1998). "Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF-kappaB site." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5): 2452-7.
- Balsa, A., L. Carmona, et al. (2004). "Value of Disease Activity Score 28 (DAS28) and DAS28-3 compared to American College of Rheumatology-defined remission in rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* 31(1): 40-6.
- Balsa, A., C. Gamallo, et al. (1993). "Histologic changes in rheumatoid synovitis induced by naproxen and methotrexate." *J Rheumatol* 20(9): 1472-7.
- Bamford, R. N., A. P. Battista, et al. (1996). "Interleukin (IL) 15/IL-T production by the adult T-cell leukemia cell line HuT-102 is associated with a human T-cell lymphotropic virus type I region /IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuates IL-15 mRNA translation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(7): 2897-902.
- Banning, M. (2005). "The principles of inflammation in the development of rheumatoid arthritis." *Br J Nurs* 14(5): 277-83.
- Barzegar, C., R. Meazza, et al. (1998). "IL-15 is produced by a subset of human melanomas, and is involved in the regulation of markers of melanoma progression through juxtacrine loops." *Oncogene* 16(19): 2503-12.
- Baslund, B., N. Tvede, et al. (2005). "Targeting interleukin-15 in patients with rheumatoid arthritis: a proof-of-concept study." *Arthritis Rheum* 52(9): 2686-92.
- Bernard, J., C. Harb, et al. (2004). "Identification of an interleukin-15alpha receptor-binding site on human interleukin-15." *J Biol Chem* 279(23): 24313-22.
- Briard, D., D. Brouty-Boye, et al. (2002). "Fibroblasts from human spleen regulate NK cell differentiation from blood CD34(+) progenitors via cell surface IL-15." *J Immunol* 168(9): 4326-32.

- Buckley, C. D., D. Pilling, et al. (2001). "Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation." *Trends Immunol* 22(4): 199-204.
- Budagian, V., E. Bulanova, et al. (2004). "Reverse signaling through membrane-bound interleukin-15." *J Biol Chem* 279(40): 42192-201.
- Burger, D., R. Rezzonico, et al. (1998). "Imbalance between interstitial collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in synoviocytes and fibroblasts upon direct contact with stimulated T lymphocytes: involvement of membrane-associated cytokines." *Arthritis Rheum* 41(10): 1748-59.
- Burgess, T. L., Y. Qian, et al. (1999). "The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts." *J Cell Biol* 145(3): 527-38.
- Casiano, C. A., S. J. Martin, et al. (1996). "Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO-1)-mediated T cell apoptosis." *J Exp Med* 184(2): 765-70.
- Castor, C. W. and E. L. Dorstewitz (1966). "Abnormalities of connective tissue cells cultured from patients with rheumatoid arthritis. I. Relative unresponsiveness of rheumatoid synovial cells to hydrocortisone." *J Lab Clin Med* 68(2): 300-13.
- Chabaud, M., F. Fossiez, et al. (1998). "Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines." *J Immunol* 161(1): 409-14.
- Chizzolini, C., R. Chicheportiche, et al. (1997). "Human Th1 cells preferentially induce interleukin (IL)-1 $\beta$  while Th2 cells induce IL-1 receptor antagonist production upon cell/cell contact with monocytes." *Eur J Immunol* 27(1): 171-7.
- Choy, E. H. and G. S. Panayi (2001). "Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis." *N Engl J Med* 344(12): 907-16.
- Clancy R, A. A., Chiopelas E, Azar N, Miranda-Carús ME, Buyon JP. (2001). Pivotal role of human fetal cardiac fibroblasts in the pathogenesis of autoantibody-associated Congenital Heart Block.
- Colucci, S., G. Brunetti, et al. (2004). "T cells support osteoclastogenesis in an in vitro model derived from human multiple myeloma bone disease: the role of the OPG/TRAIL interaction." *Blood* 104(12): 3722-30.
- Corrigall, V. M., E. Solau-Gervais, et al. (2000). "Lack of CD80 expression by fibroblast-like synoviocytes leading to anergy in T lymphocytes." *Arthritis Rheum* 43(7): 1606-15.
- Cronstein, B. N., D. Naime, et al. (1993). "The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation." *J Clin Invest* 92(6): 2675-82.
- D, O. G., D. Ireland, et al. (2004). "Joint erosion in rheumatoid arthritis: interactions between tumour necrosis factor alpha, interleukin 1, and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclasts." *Ann Rheum Dis* 63(4): 354-9.



- Dai, S. M., K. Nishioka, et al. (2004). "Interleukin (IL) 18 stimulates osteoclast formation through synovial T cells in rheumatoid arthritis: comparison with IL1 beta and tumour necrosis factor alpha." *Ann Rheum Dis* 63(11): 1379-86.
- D'Amelio, P., A. Grimaldi, et al. (2005). "Spontaneous osteoclast formation from peripheral blood mononuclear cells in postmenopausal osteoporosis." *Faseb J* 19(3): 410-2.
- Dayer, J. M., U. Feige, et al. (2001). "Anti-interleukin-1 therapy in rheumatic diseases." *Curr Opin Rheumatol* 13(3): 170-6.
- Doan, T. and E. Massarotti (2005). "Rheumatoid arthritis: an overview of new and emerging therapies." *J Clin Pharmacol* 45(7): 751-62.
- Dolhain, R. J., P. P. Tak, et al. (1998). "Methotrexate reduces inflammatory cell numbers, expression of monokines and of adhesion molecules in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis." *Br J Rheumatol* 37(5): 502-8.
- Dubois, S., J. Mariner, et al. (2002). "IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells." *Immunity* 17(5): 537-47.
- Edwards, C. J. (2005). "Immunological therapies for rheumatoid arthritis." *Br Med Bull* 73-74: 71-82.
- Emery, J. G., P. McDonnell, et al. (1998). "Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL." *J Biol Chem* 273(23): 14363-7.
- Ferrari-Lacraz, S., E. Zanelli, et al. (2004). "Targeting IL-15 receptor-bearing cells with an antagonist mutant IL-15/Fc protein prevents disease development and progression in murine collagen-induced arthritis." *J Immunol* 173(9): 5818-26.
- Firestein, G. S. (1996). "Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors?" *Arthritis Rheum* 39(11): 1781-90.
- Fox, D. A. (1997). "The role of T cells in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: new perspectives." *Arthritis Rheum* 40(4): 598-609.
- Fox, D. A. (2000). "Cytokine blockade as a new strategy to treat rheumatoid arthritis: inhibition of tumor necrosis factor." *Arch Intern Med* 160(4): 437-44.
- Franz, J. K., S. A. Kolb, et al. (1998). "Interleukin-16, produced by synovial fibroblasts, mediates chemoattraction for CD4+ T lymphocytes in rheumatoid arthritis." *Eur J Immunol* 28(9): 2661-71.
- Fry, T. J. and C. L. Mackall (2002). "Interleukin-7: from bench to clinic." *Blood* 99(11): 3892-904.
- Gay, S. (2001). "Rheumatoid arthritis." *Curr Opin Rheumatol* 13(3): 191-2.
- Geginat, J., F. Sallusto, et al. (2001). "Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells." *J Exp Med* 194(12): 1711-9.
- Giri, J. G., M. Ahdieh, et al. (1994). "Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15." *Embo J* 13(12): 2822-30.

- Goldring, S. R. (2002). "Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis." *Curr Opin Rheumatol* 14(4): 406-10.
- Gonzalez-Alvaro, I., A. M. Ortiz, et al. (2003). "Increased serum levels of interleukin-15 in rheumatoid arthritis with long- term disease." *Clin Exp Rheumatol* 21(5): 639-42.
- Goronzy, J. J. and C. M. Weyand (2005). "Rheumatoid arthritis." *Immunol Rev* 204: 55-73.
- Grabstein, K. H., J. Eisenman, et al. (1994). "Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor." *Science* 264(5161): 965-8.
- Graninger, W. B. and J. S. Smolen (2001). "One-year inhibition of tumor necrosis factor-alpha: a major success or a larger puzzle?" *Curr Opin Rheumatol* 13(3): 209-13.
- Gravallese, E. M. (2002). "Bone destruction in arthritis." *Ann Rheum Dis* 61 Suppl 2: ii84-6.
- Gravallese, E. M., Y. Harada, et al. (1998). "Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis." *Am J Pathol* 152(4): 943-51.
- Gravallese, E. M., C. Manning, et al. (2000). "Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor." *Arthritis Rheum* 43(2): 250-8.
- Harada, S., M. Yamamura, et al. (1999). "Production of interleukin-7 and interleukin-15 by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 42(7): 1508-16.
- Haynes, B. F., B. J. Grover, et al. (1988). "Synovial microenvironment-T cell interactions. Human T cells bind to fibroblast-like synovial cells in vitro." *Arthritis Rheum* 31(8): 947-55.
- Hogaboam, C. M., C. L. Bone-Larson, et al. (1999). "Differential monocyte chemoattractant protein-1 and chemokine receptor 2 expression by murine lung fibroblasts derived from Th1- and Th2-type pulmonary granuloma models." *J Immunol* 163(4): 2193-201.
- Hogaboam, C. M., M. L. Steinhauser, et al. (1998). "Novel roles for chemokines and fibroblasts in interstitial fibrosis." *Kidney Int* 54(6): 2152-9.
- Holland, J. and T. Owens (1997). "Signaling through intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in a B cell lymphoma line. The activation of Lyn tyrosine kinase and the mitogen-activated protein kinase pathway." *J Biol Chem* 272(14): 9108-12.
- Ichikawa, K., W. Liu, et al. (2003). "TRAIL-R2 (DR5) mediates apoptosis of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis." *J Immunol* 171(2): 1061-9.
- Ichikawa, K., W. Liu, et al. (2001). "Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity." *Nat Med* 7(8): 954-60.
- Ikeda, T., M. Kasai, et al. (2003). "Multimerization of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) isoforms and regulation of osteoclastogenesis." *J Biol Chem* 278(47): 47217-22.

- Isler, P., E. Vey, et al. (1993). "Cell surface glycoproteins expressed on activated human T cells induce production of interleukin-1 beta by monocytic cells: a possible role of CD69." *Eur Cytokine Netw* 4(1): 15-23.
- Jo, M., T. H. Kim, et al. (2000). "Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand." *Nat Med* 6(5): 564-7.
- Jones, E. A., A. English, et al. (2004). "Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis." *Arthritis Rheum* 50(3): 817-27.
- Kanamaru, F., H. Iwai, et al. (2004). "Expression of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) in human T cells." *Immunol Lett* 94(3): 239-46.
- Kinne, R. W., R. Brauer, et al. (2000). "Macrophages in rheumatoid arthritis." *Arthritis Res* 2(3): 189-202.
- Kitaura, H., M. S. Sands, et al. (2004). "Marrow stromal cells and osteoclast precursors differentially contribute to TNF-alpha-induced osteoclastogenesis in vivo." *J Immunol* 173(8): 4838-46.
- Kobayashi, K., N. Takahashi, et al. (2000). "Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction." *J Exp Med* 191(2): 275-86.
- Koenders, M. I., E. Lubberts, et al. (2005). "Induction of cartilage damage by overexpression of T cell interleukin-17A in experimental arthritis in mice deficient in interleukin-1." *Arthritis Rheum* 52(3): 975-83.
- Kotake, S., N. Udagawa, et al. (2001). "Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients." *Arthritis Rheum* 44(5): 1003-12.
- Kotake, S., N. Udagawa, et al. (1999). "IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis." *J Clin Invest* 103(9): 1345-52.
- Kotzin, B. L., M. T. Falta, et al. (2000). "Use of soluble peptide-DR4 tetramers to detect synovial T cells specific for cartilage antigens in patients with rheumatoid arthritis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(1): 291-6.
- Kraan, M. C., B. M. de Koster, et al. (2000). "Inhibition of neutrophil migration soon after initiation of treatment with leflunomide or methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: findings in a prospective, randomized, double-blind clinical trial in fifteen patients." *Arthritis Rheum* 43(7): 1488-95.
- Krzesicki, R. F., W. E. Fleming, et al. (1991). "T lymphocyte adhesion to human synovial fibroblasts. Role of cytokines and the interaction between intercellular adhesion molecule 1 and CD11a/CD18." *Arthritis Rheum* 34(10): 1245-53.

- Ku, C. C., M. Murakami, et al. (2000). "Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines." *Science* 288(5466): 675-8.
- Kurowska, M., W. Rudnicka, et al. (2002). "Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients express functional IL-15 receptor complex: endogenous IL-15 in autocrine fashion enhances cell proliferation and expression of Bcl-x(L) and Bcl-2." *J Immunol* 169(4): 1760-7.
- Kwan Tat, S., M. Padrines, et al. (2004). "IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology." *Cytokine Growth Factor Rev* 15(1): 49-60.
- Lacey, D. L., E. Timms, et al. (1998). "Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation." *Cell* 93(2): 165-76.
- Lacraz, S., P. Isler, et al. (1994). "Direct contact between T lymphocytes and monocytes is a major pathway for induction of metalloproteinase expression." *J Biol Chem* 269(35): 22027-33.
- Lam, J., S. Takeshita, et al. (2000). "TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand." *J Clin Invest* 106(12): 1481-8.
- Lamhamedi-Cherradi, S. E., S. J. Zheng, et al. (2003). "Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice." *Nat Immunol* 4(3): 255-60.
- Lard, L. R., M. Boers, et al. (2002). "Early and aggressive treatment of rheumatoid arthritis patients affects the association of HLA class II antigens with progression of joint damage." *Arthritis Rheum* 46(4): 899-905.
- Lau, L. L., B. D. Jamieson, et al. (1994). "Cytotoxic T-cell memory without antigen." *Nature* 369(6482): 648-52.
- Lee, D. M. and M. E. Weinblatt (2001). "Rheumatoid arthritis." *Lancet* 358(9285): 903-11.
- Lee, J. H., L. Del Sorbo, et al. (2004). "Intercellular adhesion molecule-1 mediates cellular cross-talk between parenchymal and immune cells after lipopolysaccharide neutralization." *J Immunol* 172(1): 608-16.
- Li, X. C., G. Demirci, et al. (2001). "IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo." *Nat Med* 7(1): 114-8.
- Liew, F. Y. and I. B. McInnes (2002). "Role of interleukin 15 and interleukin 18 in inflammatory response." *Ann Rheum Dis* 61 Suppl 2: ii100-2.
- Lindhout, E., M. van Eijk, et al. (1999). "Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients have intrinsic properties of follicular dendritic cells." *J Immunol* 162(10): 5949-56.
- Liu, K., M. Catalfamo, et al. (2002). "IL-15 mimics T cell receptor crosslinking in the induction of cellular proliferation, gene expression, and cytotoxicity in CD8+ memory T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(9): 6192-7.

- Lodolce, J. P., P. R. Burkett, et al. (2001). "T cell-independent interleukin 15 signals are required for bystander proliferation." *J Exp Med* 194(8): 1187-94.
- Lodolce, J. P., P. R. Burkett, et al. (2002). "Regulation of lymphoid homeostasis by interleukin-15." *Cytokine Growth Factor Rev* 13(6): 429-39.
- Lubberts, E., M. I. Koenders, et al. (2005). "The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models." *Arthritis Res Ther* 7(1): 29-37.
- Lum, L., B. R. Wong, et al. (1999). "Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival." *J Biol Chem* 274(19): 13613-8.
- Macallan, D. C., D. Wallace, et al. (2004). "Rapid turnover of effector-memory CD4(+) T cells in healthy humans." *J Exp Med* 200(2): 255-60.
- Mackay, J. M., G. Panayi, et al. (1974). "Cytology of rheumatoid synovial cells in culture. I. Composition and sequence of cell populations in cultures of rheumatoid synovial fluid." *Ann Rheum Dis* 33(3): 225-33.
- Malyankar, U. M., M. Scatena, et al. (2000). "Osteoprotegerin is an alpha v beta 3-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells." *J Biol Chem* 275(28): 20959-62.
- Manjunath, N., P. Shankar, et al. (2001). "Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes." *J Clin Invest* 108(6): 871-8.
- McInnes, I. B., J. al-Mughales, et al. (1996). "The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis." *Nat Med* 2(2): 175-82.
- McInnes, I. B., J. A. Gracie, et al. (2003). "New strategies to control inflammatory synovitis: interleukin 15 and beyond." *Ann Rheum Dis* 62 Suppl 2: ii51-4.
- McInnes, I. B., B. P. Leung, et al. (2000). "Cell-cell interactions in synovitis. Interactions between T lymphocytes and synovial cells." *Arthritis Res* 2(5): 374-8.
- McInnes, I. B., B. P. Leung, et al. (1997). "Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis." *Nat Med* 3(2): 189-95.
- McInnes, I. B. and F. Y. Liew (1998). "Interleukin 15: a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis." *Immunol Today* 19(2): 75-9.
- McInnes, I. B. and G. Schett (2007). "Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *Nat Rev Immunol* 7(6): 429-42.
- Min, H., S. Morony, et al. (2000). "Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis." *J Exp Med* 192(4): 463-74.
- Miranda-Carus, M. E., A. Balsa, et al. (2004). "IL-15 and the initiation of cell contact-dependent synovial fibroblast-T lymphocyte cross-talk in rheumatoid arthritis: effect of methotrexate." *J Immunol* 173(2): 1463-76.

- Murakami, S., E. Hino, et al. (1999). "Direct interaction between gingival fibroblasts and lymphoid cells induces inflammatory cytokine mRNA expression in gingival fibroblasts." *J Dent Res* 78(1): 69-76.
- Murali-Krishna, K., L. L. Lau, et al. (1999). "Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice." *Science* 286(5443): 1377-81.
- Nanki, T., K. Hayashida, et al. (2000). "Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium." *J Immunol* 165(11): 6590-8.
- Neely, G. G., S. Epelman, et al. (2004). "Monocyte surface-bound IL-15 can function as an activating receptor and participate in reverse signaling." *J Immunol* 172(7): 4225-34.
- Neely, G. G., S. M. Robbins, et al. (2001). "Lipopolysaccharide-stimulated or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-stimulated monocytes rapidly express biologically active IL-15 on their cell surface independent of new protein synthesis." *J Immunol* 167(9): 5011-7.
- Neidhart, M., C. A. Seemayer, et al. (2003). "Functional characterization of adherent synovial fluid cells in rheumatoid arthritis: destructive potential in vitro and in vivo." *Arthritis Rheum* 48(7): 1873-80.
- Ogasawara, H., N. Takeda-Hirokawa, et al. (1999). "Inhibitory effect of interleukin-16 on interleukin-2 production by CD4+ T cells." *Immunology* 96(2): 215-9.
- Ogata, Y., A. Kukita, et al. (1999). "A novel role of IL-15 in the development of osteoclasts: inability to replace its activity with IL-2." *J Immunol* 162(5): 2754-60.
- Pap, T., U. Muller-Ladner, et al. (2000). "Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *Arthritis Res* 2(5): 361-7.
- Pettit, A. R., H. Ji, et al. (2001). "TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis." *Am J Pathol* 159(5): 1689-99.
- Pilling, D., A. N. Akbar, et al. (2000). "High cell density provides potent survival signals for resting T-cells." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46(1): 163-74.
- Postlethwaite, A. E. (1995). "Role of T cells and cytokines in effecting fibrosis." *Int Rev Immunol* 12(2-4): 247-58.
- Poudrier, J. and T. Owens (1994). "CD54/intercellular adhesion molecule 1 and major histocompatibility complex II signaling induces B cells to express interleukin 2 receptors and complements help provided through CD40 ligation." *J Exp Med* 179(5): 1417-27.
- Pritchard, J., N. Horst, et al. (2002). "Igs from patients with Graves' disease induce the expression of T cell chemoattractants in their fibroblasts." *J Immunol* 168(2): 942-50.
- Prlic, M., L. Lefrancois, et al. (2002). "Multiple choices: regulation of memory CD8 T cell generation and homeostasis by interleukin (IL)-7 and IL-15." *J Exp Med* 195(12): F49-52.

- Rappl, G., A. Kapsokafalou, et al. (2001). "Dermal fibroblasts sustain proliferation of activated T cells via membrane-bound interleukin-15 upon long-term stimulation with tumor necrosis factor-alpha." *J Invest Dermatol* 116(1): 102-9.
- Redlich, K., S. Hayer, et al. (2002). "Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction." *J Clin Invest* 110(10): 1419-27.
- Rezzonico, R., D. Burger, et al. (1998). "Direct contact between T lymphocytes and human dermal fibroblasts or synoviocytes down-regulates types I and III collagen production via cell-associated cytokines." *J Biol Chem* 273(30): 18720-8.
- Ritchlin, C. T., S. A. Haas-Smith, et al. (2003). "Mechanisms of TNF-alpha- and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis." *J Clin Invest* 111(6): 821-31.
- Romas, E., O. Bakharevski, et al. (2000). "Expression of osteoclast differentiation factor at sites of bone erosion in collagen-induced arthritis." *Arthritis Rheum* 43(4): 821-6.
- Romas, E., M. T. Gillespie, et al. (2002). "Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis." *Bone* 30(2): 340-6.
- Ruchatz, H., B. P. Leung, et al. (1998). "Soluble IL-15 receptor alpha-chain administration prevents murine collagen-induced arthritis: a role for IL-15 in development of antigen-induced immunopathology." *J Immunol* 160(11): 5654-60.
- Saalbach, A., U. F. Haustein, et al. (2000). "A ligand of human thy-1 is localized on polymorphonuclear leukocytes and monocytes and mediates the binding to activated thy-1-positive microvascular endothelial cells and fibroblasts." *J Invest Dermatol* 115(5): 882-8.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (2002). "The instructive role of dendritic cells on T-cell responses." *Arthritis Res* 4 Suppl 3: S127-32.
- Sallusto, F., D. Lenig, et al. (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." *Nature* 401(6754): 708-12.
- Salmon, M., D. Scheel-Toellner, et al. (1997). "Inhibition of T cell apoptosis in the rheumatoid synovium." *J Clin Invest* 99(3): 439-46.
- Sancho, D., M. Gomez, et al. (2003). "CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-beta production in collagen-induced arthritis." *J Clin Invest* 112(6): 872-82.
- Sancho, D., M. Yanez-Mo, et al. (1999). "Activation of peripheral blood T cells by interaction and migration through endothelium: role of lymphocyte function antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-15." *Blood* 93(3): 886-96.
- Schluns, K. S., W. C. Kieper, et al. (2000). "Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo." *Nat Immunol* 1(5): 426-32.

- Scott, S., F. Pandolfi, et al. (1990). "Fibroblasts mediate T cell survival: a proposed mechanism for retention of primed T cells." *J Exp Med* 172(6): 1873-6.
- Sebbag, M., S. L. Parry, et al. (1997). "Cytokine stimulation of T lymphocytes regulates their capacity to induce monocyte production of tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-10: possible relevance to pathophysiology of rheumatoid arthritis." *Eur J Immunol* 27(3): 624-32.
- Seddon, B., P. Tomlinson, et al. (2003). "Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells." *Nat Immunol* 4(7): 680-6.
- Seddon, B. and R. Zamoyska (2002). "TCR and IL-7 receptor signals can operate independently or synergize to promote lymphopenia-induced expansion of naive T cells." *J Immunol* 169(7): 3752-9.
- Sheridan, J. P., S. A. Marsters, et al. (1997). "Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors." *Science* 277(5327): 818-21.
- Shigeyama, Y., T. Pap, et al. (2000). "Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 43(11): 2523-30.
- Shingu, M., M. Hashimoto, et al. (1994). "Effect of cytokine-induced soluble ICAM-1 from human synovial cells on synovial cell-lymphocyte adhesion." *Clin Exp Immunol* 98(1): 46-51.
- Skapenko, A., J. Wendler, et al. (1999). "Altered memory T cell differentiation in patients with early rheumatoid arthritis." *J Immunol* 163(1): 491-9.
- Smith, R. S., T. J. Smith, et al. (1997). "Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation." *Am J Pathol* 151(2): 317-22.
- Song, K., Y. Chen, et al. (2000). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression." *J Exp Med* 191(7): 1095-104.
- Sprent, J. (1993). "Lifespans of naive, memory and effector lymphocytes." *Curr Opin Immunol* 5(3): 433-8.
- Sprent, J., D. F. Tough, et al. (1997). "Factors controlling the turnover of T memory cells." *Immunol Rev* 156: 79-85.
- Striebich, C. C., M. T. Falta, et al. (1998). "Selective accumulation of related CD4+ T cell clones in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis." *J Immunol* 161(8): 4428-36.
- Stuhlmüller, B., U. Ungethum, et al. (2000). "Identification of known and novel genes in activated monocytes from patients with rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 43(4): 775-90.
- Swain, S. L., H. Hu, et al. (1999). "Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors." *Science* 286(5443): 1381-3.



- Takayanagi, H., H. Iizuka, et al. (2000). "Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 43(2): 259-69.
- Teitelbaum, S. L. (2000). "Bone resorption by osteoclasts." *Science* 289(5484): 1504-8.
- Theoleyre, S., Y. Wittrant, et al. (2004). "The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling." *Cytokine Growth Factor Rev* 15(6): 457-75.
- Thurkow, E. W., I. M. van der Heijden, et al. (1997). "Increased expression of IL-15 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis compared with patients with Yersinia-induced arthritis and osteoarthritis." *J Pathol* 181(4): 444-50.
- Tsai, C., L. A. Diaz, Jr., et al. (1996). "Responsiveness of human T lymphocytes to bacterial superantigens presented by cultured rheumatoid arthritis synoviocytes." *Arthritis Rheum* 39(1): 125-36.
- Udagawa, N., S. Kotake, et al. (2002). "The molecular mechanism of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis." *Arthritis Res* 4(5): 281-9.
- Unutmaz, D., P. Pileri, et al. (1994). "Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination." *J Exp Med* 180(3): 1159-64.
- Uppal, S. S., R. Raghupathy, et al. (2007). "Patient demographics and disease variables correlate with distinct cytokine patterns in mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients." *Rheumatol Int*.
- Vallejo, A. N., H. Yang, et al. (2003). "Synovocyte-mediated expansion of inflammatory T cells in rheumatoid synovitis is dependent on CD47-thrombospondin 1 interaction." *J Immunol* 171(4): 1732-40.
- van der Heijde, D. M., P. L. van Riel, et al. (1989). "Effects of hydroxychloroquine and sulphasalazine on progression of joint damage in rheumatoid arthritis." *Lancet* 1(8646): 1036-8.
- Walczak, H., R. E. Miller, et al. (1999). "Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo." *Nat Med* 5(2): 157-63.
- Wei, S., H. Kitaura, et al. (2005). "IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis." *J Clin Invest* 115(2): 282-90.
- Welsing, P. M., R. B. Landewe, et al. (2004). "The relationship between disease activity and radiologic progression in patients with rheumatoid arthritis: a longitudinal analysis." *Arthritis Rheum* 50(7): 2082-93.
- Wenxin, L., F. Jinxiang, et al. (2005). "Expression of membrane-bound IL-15 by bone marrow fibroblast-like stromal cells in aplastic anemia." *Int Immunol* 17(4): 429-37.

- Wong, B. R., R. Josien, et al. (1997). "TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor." *J Exp Med* 186(12): 2075-80.
- Yamamura, Y., R. Gupta, et al. (2001). "Effector function of resting T cells: activation of synovial fibroblasts." *J Immunol* 166(4): 2270-5.
- Yasuda, H., N. Shima, et al. (1998). "Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7): 3597-602.
- Zaph, C., J. Uzonna, et al. (2004). "Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites." *Nat Med* 10(10): 1104-10.
- Zhang, H., Y. Yang, et al. (1997). "Amelioration of collagen-induced arthritis by CD95 (Apo-1/Fas)-ligand gene transfer." *J Clin Invest* 100(8): 1951-7.
- Zhang, Y., H. J. Cao, et al. (1998). "CD40 engagement up-regulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts." *J Immunol* 160(3): 1053-7.
- Ziolkowska, M., A. Koc, et al. (2000). "High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism." *J Immunol* 164(5): 2832-8.
- Zou, W., I. Hakim, et al. (2001). "Tumor necrosis factor-alpha mediates RANK ligand stimulation of osteoclast differentiation by an autocrine mechanism." *J Cell Biochem* 83(1): 70-83.
- Zwerina, J., S. Hayer, et al. (2004). "Single and combined inhibition of tumor necrosis factor, interleukin-1, and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis: effects on synovial inflammation, bone erosion, and cartilage destruction." *Arthritis Rheum* 50(1): 277-90.

